

Université de Montréal

**Régression de la calcification artérielle médiale
comme avenue thérapeutique potentielle pour
l'hypertension systolique isolée**

par

Rachida Essalihi

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

août, 2006

© Rachida Essalihi, 2006



QV
705
U58
2006
V.023

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Régression de la calcification artérielle médiale comme avenue thérapeutique
potentielle pour l'hypertension systolique isolée

présentée par :
Rachida Essalihi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Albert Adam, président-rapporteur
Pierre Moreau, directeur de recherche
Marc D. McKee, co-directeur
Éric Thorin, membre du jury
Patrick Mathieu, examinateur externe
représentant du doyen de la FES



Résumé

L'hypertension systolique isolée (HSI) est la forme d'hypertension prédominante chez les personnes âgées de plus de 65 ans, c'est un facteur de risque important pour la morbidité et la mortalité cardiovasculaires. L'HSI est caractérisée par une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS) sans changement ou légère diminution de la pression artérielle diastolique (PAD). Il y a donc une élévation de la pression pulsée ($PP = PAS - PAD$) et aucun changement de la pression artérielle moyenne ($PAM = (PAS + 2PAD)/3$). L'augmentation de la rigidité des grosses artères telle l'aorte est la principale cause du développement de l'HSI. La rigidité artérielle peut être induite par la calcification et la fragmentation des lamelles élastiques et l'augmentation des composantes rigides comme le collagène. Les objectifs de cette thèse étaient donc 1) de développer un modèle expérimental d'HSI basé sur la calcification artérielle médiale ou élastocalcinose, puis, 2) d'évaluer l'impact de certains antihypertenseurs sur ce modèle afin de mieux comprendre comment il serait possible, dans l'avenir, de traiter directement l'élastocalcinose et la rigidité des gros troncs afin de diminuer sélectivement la PAS et la PP.

L'inhibition de la γ -carboxylation de la *matrix Gla protein* (MGP), une protéine qui empêche normalement la calcification vasculaire, par un traitement chronique à la warfarine / vitamine K (WVK) a permis d'induire une calcification artérielle médiale des artères de conductance. Par conséquent, une élévation sélective de la PAS et de la PP ont été observés chez les rats WVK. La PAD et la PAM n'ont pas été affectées par le traitement

WVK. Ce traitement a également augmenté le contenu global en collagène et diminué celui en élastine de la paroi aortique. La vitesse de l'onde de pouls (*pulse wave velocity*, PWV), un indice de rigidité aortique, est augmentée chez les rats WVK, confirmant l'élévation de la rigidité aortique. De plus, par immunohistochimie, dans les zones de calcification aortique, il y a eu une diminution importante de l'expression de l' α -actine et une apparition d'ostéopontine, mais pas d'ostéoprotégérine. Afin d'identifier le nouveau type cellulaire présent dans ces zones spécifiques, des colorations par histochimie ou par immunohistochimie pour des chondrocytes et un marqueur de macrophages ont été utilisées, elles ont toutefois été négatives.

L'administration d'un antagoniste des récepteurs de l'endothéline (ET), le darusantan, et d'un bloqueur des canaux calciques, l'amlodipine, ont permis non seulement de prévenir, mais aussi de régresser l'élastocalcinose et l'élévation de la PP induites par le traitement WVK chez le rat. Diverses approches moléculaires (immunohistochimie, immunobuvardage et mesure d'activité enzymatique) et pharmacologiques (utilisation d'un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, l'acétazolamide) ont montré que la régression de l'élastocalcinose aortique par le darusantan est dépendante de l'activation d'une forme membranaire de l'anhydrase carbonique (AC). Cette enzyme est d'ailleurs essentielle à la résorption osseuse (acidification de la matrice osseuse pour permettre sa déminéralisation).

L'amlodipine n'a pas permis de diminuer la fibrose et la distorsion des lamelles élastiques observées dans les zones de calcification aortique. L'élastocalcinose au niveau

des carotides, ainsi que la PWV sont demeurées élevées, suggérant que l'amélioration de la compliance aortique ne passe pas seulement par la déminéralisation de l'aorte, mais pourrait aussi nécessiter une amélioration de fibrose.

En conclusion, nous avons mis au point un nouveau modèle expérimental d'HSI chez le rat ayant plusieurs caractéristiques retrouvées chez la pathologie humaine. De plus, la régression de l'élastocalcinose dépend de l'activation de l'AC, suggérant des changements locaux de pH afin de dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite présents sur les lamelles élastiques. Par contre, cette régression n'est pas suffisante pour améliorer la compliance aortique suggérant qu'il faut également tenir compte de la fibrose qui se développe dans les zones calcifiées. Ce modèle pourra donc être très utile afin de trouver de nouveaux outils pharmacologiques capables de réduire spécifiquement la rigidité artérielle responsable du développement de l'HSI.

Mots-clés : Hypertension systolique isolée, élastocalcinose, minéralisation, rigidité artérielle, matrice extracellulaire, endothéline, anhydrase carbonique, bloqueur des canaux calciques.

Abstract

Isolated systolic hypertension (ISH) is the predominant form of hypertension in the elderly, and it is an important predictor of cardiovascular morbidity and mortality. ISH is characterized by a selective elevation of systolic arterial pressure (SAP) over diastolic arterial pressure (DAP). Indeed, there is an increase of pulse pressure ($PP = SAP - DAP$) and no change of mean arterial pressure ($MAP = (SAP + 2DAP)/3$). The augmentation of aortic stiffness is the main cause of ISH development. Calcification and fragmentation of elastic lamellae, and an increase in rigid components of the aorta like collagen contribute to the elevation of arterial stiffness. The objectives of this thesis were 1) to develop an experimental model of ISH based on medial arterial calcification (elastocalcinosis), and 2) to evaluate the impact of antihypertensive treatments on this model to better understand how to treat directly elastocalcinosis and large artery stiffness to decrease selectively SAP and PP.

Inhibition of γ -carboxylation of matrix GLA protein, a protein which protects arteries from calcification, by a chronic warfarin / vitamin K (WVK) treatment induced elastocalcinosis in large arteries of rats. An elevation of SAP and PP were also observed in WVK rats. The DAP and MAP were not affected by the WVK treatment. The treatment also increased collagen content and diminished elastin in the aortic wall. The pulse wave velocity (PWV), an index of aortic rigidity, was increased in WVK rats, confirming the elevation of aortic stiffness. Moreover, by immunohistochemistry, at sites of calcification

in the aortic wall, there was a decrease in α -actin, and an appearance of osteopontin but not of osteoprotegerin. To identify cellular types in calcification zones, histochemical staining or immunostaining were used for chondrocytes and macrophage markers, but the cells were negative for these markers.

The administration of an endothelin receptor antagonist (ETRA, Darusantan) and a calcium channel blocker (CCB, Amlodipine) not only prevented, but also regressed the elastocalcinosis and the elevation of PP induced by WVK treatment. Immunohistochemistry, Western blotting and enzymatic activity measurements, and pharmacological (use of a carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide) approaches, showed that regression of elastocalcinosis induced by the ETRA was dependant on the activation of a membrane-bound form of carbonic anhydrase (CA). This enzyme is essential to bone resorption (osteoblastic acidification of the extracellular compartment to allow bone matrix demineralization).

The Amlodipine did not reduce the fibrosis and the distortion of elastic lamellae observed in aortic calcification sites. The elastocalcinosis of carotid arteries and the PWV remained increased, suggesting that demineralization of aortic wall is not enough to observed an amelioration of aortic compliance.

In conclusion, chronic treatment with WVK represents a new model of ISH with several characteristics of the human disease. In addition, vascular mineral loss induced by an ETRA seems dependent on the activation of CA, suggesting that mineral loss may

proceed via local changes in pH to dissolve hydroxyapatite crystals within elastic lamellae. However, since this mineral loss did not ameliorate aortic compliance, fibrosis of vascular wall is something that must be examined further. This experimental model of ISH provides a tool for investigating new antihypertensive drugs potentially capable of reducing large artery stiffness responsible for ISH development.

Keywords : Isolated systolic hypertension, elastocalcinosis, mineralization, arterial stiffness, extracellular matrix, endothelin, carbonic anhydrase, calcium channel blocker.

Table des matières

CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1. HYPERTENSION ESSENTIELLE	2
1.1.1. HYPERTENSION SYSTOLO-DIASTOLIQUE	6
a. Définition	6
b. Physiopathologie	8
c. Impact sur les organes cibles	9
d. Antihypertenseurs	10
Les diurétiques	10
Les β -bloquants	10
Les α -bloquants	12
Les bloqueurs du système rénine-angiotensine	13
Les bloqueurs des canaux calciques	14
Les vasodilatateurs directs	15
1.1.2. HYPERTENSION SYSTOLIQUE ISOLÉE	16
a. Définition et prévalence	16
b. Physiopathologie	18
c. Impact sur les organes cibles	21
d. Études cliniques et traitements	21
1.2. LES ARTÈRES DE CONDUCTANCE	28
1.2.1. STRUCTURE ET FONCTION	28
a. Endothélium	31
i. L'endothéline	34
Isoformes	34
Biosynthèse	34
Récepteurs	35
Effets vasculaires	36
Voix de signalisation activées	36

Antagonistes des récepteurs de l'endothéline	39
b. Tunique médiale	39
i. Méthodes utilisées pour mesurer la rigidité artérielle	40
1.2.2. ALTÉRATION DES ARTÈRES DE CONDUCTANCE DANS LE VIEILLISSEMENT	42
a. Dysfonction endothéliale	44
b. Détérioration de la composition de la tunique médiale	46
i. Les CMLVs	46
ii. Le collagène	46
iii. Les lamelles élastiques	50
c. Calcification artérielle médiale ou élastocalcinose	52
i. Parallèles entre la biominéralisation osseuse et la calcification vasculaire	56
ii. Médiateurs moléculaires communs à la biominéralisation osseuse et à la calcification artérielle médiale	60
<i>Matrix Gla protein</i>	60
Ostéopontine	67
Ostéoprotégérine, <i>RANK</i> et <i>RANKL</i>	70
Ostéonectine	75
<i>Core Binding Factor $\alpha 1$</i>	75
<i>Bone morphogenic proteins</i>	76
<i>Bone sialoprotein</i>	78
Phosphatase alcaline	79
Ostéocalcine	80
iii. Homéostasie du calcium	83
iv. Résorption osseuse	84
v. Liens entre la résorption osseuse et la calcification vasculaire	87
vi. Rôle de l'endothéline dans la calcification	88
vii. Modèles de calcification artérielle médiale	89
Calcification vasculaire <i>in vitro</i>	89
Souris MGP déficientes	90
Rats warfarine/vitamine K	91
Rats vitamine D3/nicotine	92

Rats âgés	93
Avantages et inconvénients des différents modèles de calcification vasculaire	94
1.3. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX	95

CHAPITRE 2. A NEW MODEL OF ISOLATED SYSTOLIC HYPERTENSION INDUCED BY CHRONIC WARFARIN AND VITAMIN K₁ TREATMENT

2.1. ABSTRACT	98
2.2. INTRODUCTION	100
2.3. METHODS	102
2.3.1. ANIMALS AND EXPERIMENTAL DESIGN	102
2.3.2. HEMODYNAMIC PARAMETERS	102
2.3.3. CARDIOVASCULAR STRUCTURE AND COMPOSITION	103
2.3.4. PLASMA CATECHOLAMINES AND RENIN ACTIVITY	104
2.3.5. <i>EX VIVO</i> VASCULAR REACTIVITY	105
2.3.6. DRUGS AND STATISTICAL ANALYSIS	106
2.4. RESULTS	106
2.4.1. HEMODYNAMIC PARAMETERS, WEIGHT AND CARDIAC REMODELING	106
2.4.2. CALCIUM CONTENT IN TISSUES	107
2.4.3. STRUCTURE, COLLAGEN AND ELASTIN CONTENT OF AORTA	107
2.4.4. VASCULAR REACTIVITY	108
2.4.5. PLASMA CATECHOLAMINES AND RENIN ACTIVITY	108
2.5. DISCUSSION	108
2.5.1. RELATIONSHIP BETWEEN CALCIFICATION, ARTERIAL STIFFENING AND ISH	109
2.5.2. IMPACT OF EXPERIMENTAL ISH ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM	111
2.6. CONCLUSION	113
2.7. ACKNOWLEDGEMENTS	113
2.8. REFERENCES	113
2.9. FIGURE LEGENDS	124

CHAPITRE 3. PHENOTYPIC MODULATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS DURING MEDIAL ARTERIAL CALCIFICATION: A ROLE FOR ENDOTHELIN? 128

3.1. ABSTRACT	129
3.2. INTRODUCTION	130
3.3. METHODS	131
3.3.1. ANIMAL AND EXPERIMENTAL PROTOCOL	131
3.3.2. IMMUNOHISTOCHEMISTRY, HISTOCHEMISTRY AND CONVENTIONAL HISTOLOGY	131
3.4. RESULTS	133
3.5. DISCUSSION	134
3.6. ACKNOWLEDGMENTS	136
3.7. REFERENCES	137
3.8. FIGURE LEGENDS	139

CHAPITRE 4. REGRESSION OF MEDIAL ELASTOCALCINOSIS IN THE RAT AORTA: A NEW FUNCTION FOR CARBONIC ANHYDRASE 142

4.1. ABSTRACT	143
4.2. INTRODUCTION	145
4.3. METHODS	147
4.3.1. ANIMALS AND EXPERIMENTAL PROTOCOL	147
4.3.2. HEMODYNAMIC PARAMETERS	147
4.3.3. IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND HISTOLOGY	148
4.3.4. WESTERN BLOTS ANALYSIS	149
4.3.5. CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY MEASUREMENT	149
4.3.6. CALCIUM DETERMINATION	150
4.3.7. MICRO-COMPUTERIZED TOMOGRAPHY (MICRO-CT)	151
4.3.8. DRUGS AND STATISTICAL ANALYSIS	151
4.4. RESULTS	152

4.4.1. LOCALIZATION, QUANTIFICATION AND ACTIVITY OF CARBONIC ANHYDRASES II AND IV	152
4.4.2. CALCIUM CONTENT IN AORTA AND CAROTID ARTERY	154
4.4.3. HEMODYNAMIC PARAMETERS	155
4.5. DISCUSSION	155
4.6. ACKNOWLEDGMENTS	159
4.7. REFERENCES	161
4.8. FIGURES LEGENDS	165

CHAPITRE 5. DISTINCT EFFECTS OF AMLODIPINE TREATMENT ON VASCULAR ELASTOCALCINOSIS AND STIFFNESS IN A RAT MODEL OF ISOLATED SYSTOLIC HYPERTENSION **176**

5.1. ABSTRACT	177
5.2. CONDENSED ABSTRACT	179
5.3. INTRODUCTION	180
5.4. METHODS	181
5.4.1. EXPERIMENTAL DESIGN AND TREATMENTS	181
5.4.2. IN VIVO HEMODYNAMIC MEASUREMENTS	182
5.4.3. DETERMINATION OF CALCIUM CONTENT AND LOCALIZATION	183
5.4.4. DETERMINATION OF COLLAGEN CONTENT	184
5.4.5. QUANTIFICATION OF ELASTIC LAMELLAE UNDULATIONS	184
5.4.6. DRUGS AND STATISTICAL ANALYSIS	185
5.5. RESULTS	186
5.5.1. CALCIUM CONTENT IN TISSUES	186
5.5.2. HEMODYNAMIC PARAMETERS	186
5.5.3. COLLAGEN CONTENT AND UNDULATION SCORE	187
5.6. DISCUSSION	187
5.7. CONCLUSION	191
5.8. ACKNOWLEDGEMENTS	192
5.9. REFERENCES	193
5.10. FIGURES LEGENDS	199

CHAPITRE 6. DISCUSSION, CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES 205

6.1. DISCUSSION	206
6.1.1. MODÈLE EXPÉRIMENTAL D'HYPERTENSION SYSTOLIQUE ISOLÉE CHEZ LE RAT INDUIT PAR UNE ÉLASTOCALCINOSE	207
a. Relation entre la calcification, la rigidité artérielle et l'hypertension systolique isolée	208
b. Changements phénotypiques des cellules du muscle lisse vasculaire	210
c. Impact de l'hypertension systolique isolé expérimentale sur le système cardiovasculaire	212
6.1.2. EFFETS DU DARUSANTAN ET DE L'AMLODIPINE SUR L'ÉLASTOCALCINOSE	214
a. Prévention de l'élastocalcinoase aortique	214
b. Régression de l'élastocalcinoase aortique	216
i. Mécanisme de régression de l'élastocalcinoase aortique par le darusantan	217
ii. Mécanisme de régression de l'élastocalcinoase aortique par l'amlodipine	219
c. Effets des antihypertenseurs sur l'élastocalcinoase dans les carotides	220
6.1.3. IMPACT DU DARUSANTAN ET DE L'AMLODIPINE SUR LES PARAMÈTRES HÉMODYNAMIQUES ET LA RIGIDITÉ ARTÉRIELLE	221
6.2. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVE	224

CHAPITRE 7. ANNEXES I

7.1. APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES	II
7.1.1. DISSECTEUR 3D	II
7.1.2. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE II ET IV TISSULAIRE	III
7.1.3. MICRO-COMPUTERIZED TOMOGRAPHY (MICRO-CT)	V
7.1.4. QUANTIFICATION DE L'ONDULATION DES LAMELLES ÉLASTIQUES	VI
7.2. ARTICLES ORIGINAUX	VII
7.3. RÉSUMÉS POUR PRÉSENTATION À DES CONGRÈS	VIII

Liste des tableaux

Tableau 1. Sommaire des études cliniques sur l'hypertension systolique isolée.	23
Tableau 2. Indices de rigidité artérielle	41
Tableau 3. Changements vasculaires associés au vieillissement.	43
Tableau 4. Calcification macrovasculaire : un point de vue histoanatomique.....	53
Tableau 5. Régulation de l'expression de l'OPG, du RANK et du RANKL au niveau des cellules endothéliales et des CMLVs.	74
Tableau 6. Médiateurs moléculaires de la calcification artérielle médiale.....	82
Tableau 7. Bilan des modèles de calcification vasculaire.	94

Liste des figures

Figure 1. La composante pulsatile et continue de la pression artérielle observée dans le système cardiovasculaire.	5
Figure 2. Évolution de la pression artérielle systolique, diastolique et pulsée au cours du vieillissement.....	17
Figure 3. Propagation de la pression pulsée (PP) de l'aorte ascendante vers les artères périphériques à différents âges chez l'homme.....	20
Figure 4. Diminution (en %) de la mortalité totale et cardiovasculaire (CV), des accidents vasculaires cérébral (ACV) et des infarctus du myocarde (IM) observée dans différentes études cliniques sur le traitement de l'hypertension systolique isolée.	27
Figure 5. Représentation schématique de la composition de la paroi vasculaire.....	29
Figure 6. Illustration de la fonction de tamponnage de l'aorte nécessaire à produire un débit sanguin continu.....	30
Figure 7. Facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium.....	33

Figure 8. Effets vasculaires de l'endothéline.	38
Figure 9. Description schématique de la formation des produits avancés de la glycation et des ponts intermoléculaires entre les fibrilles de collagène.	49
Figure 10. Incidence des patients atteints d'une calcification significative de leur aorte thoracique selon leur groupe d'âge.	55
Figure 11. Représentation schématique de la gamma-carboxylation des protéines contenant des résidus Gla et de l'effet de la warfarine sur la voie enzymatique de la vitamine K.	61
Figure 12. Représentation schématique de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite de la matrice osseuse par les ostéoclastes et rôle de l'anhydrase carbonique II (AC II) dans un ostéoclaste.	86

Liste des sigles et abréviations

ACh, acétylcholine

ACV, accident cérébral vasculaire

AGE (*advanced glycation end product*), produits avancés de la glycation

AMPC, adénosine monophosphate cyclique

Ang II, angiotensine II

ARA (angiotensin II AT₁ receptor antagonist), antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II

ARNm, acide ribonucléique messenger

BCC, bloqueur des canaux calciques

BK, bradikinine

C/E, rapport collagène sur élastine

CMLV, cellule du muscle lisse vasculaire

CSA (*cross sectional area*), aire de section

CSF-1 (*colony-stimulating factor-1*), facteur stimulant les colonies 1

CVC (*calcifying vascular cells*), cellules vasculaires se calcifiant

DAG, diacylglycérol

ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine I

ECE, enzyme de conversion de l'endothéline

EDHF (*endothelium derived hyperpolarising factor*), facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EDRF (*endothelium derived relaxing factor*), facteur relaxant dérivé de l'endothélium

EGF (*epidermal growth factor*), facteur de croissance épidermal

eNOS, (*endothelium nitric oxide synthase*), synthétase du monoxyde d'azote endothéliale

ET, endothéline

ETRA (*endothelin receptor antagonist*), antagoniste des récepteurs de l'endothéline

GMPC, guanosine monophosphate cyclique

HSD, hypertension systolo-diastolique

HSI, hypertension systolique isolée

HTAe, hypertension artérielle essentielle

IECA, inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I

IL-1 α , interleukine 1 α

IL-6, interleukine 6

iNOS (*inductible nitric oxide synthase*), synthétase du monoxyde d'azote inductible

LIFE, *Losartan Intervention for Endpoint Reduction*

LOX, lysyl oxydase

MAPK, (*mitogenic activated protein kinase*) protéine kinase activée par des mitogènes

MEC, matrice extracellulaire

MGP (*matrix Gla protein*), protéine Gla de la matrice

MMP, (*matrix metalloproteinase*) métalloprotéinase matricielle

NCP (*noncollagenous proteins*), protéines ne contenant pas de collagène

nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*), synthétase du monoxyde d'azote neuronale

NO, monoxyde d'azote

NOS (*nitric oxide synthase*), synthétase du monoxyde d'azote

OPG, ostéoprotégérine

OPN, ostéopontine

OSX, ostérix

PAD, pression artérielle diastolique

PAM, pression artérielle moyenne

PAS, pression artérielle systolique

PDGF (*platelet derived growth factor*), facteur de croissance dérivé des plaquettes

PG, protéoglycan

PGE₂, prostaglandine E₂

PGH₂, prostaglandine H₂

PGI₂, prostacycline

PKC, protéine kinase C

PLC, phospholipase C

PP, pression pulsée

PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*), récepteur activé par les peroxisomes proliférateurs de type γ

PTH (*parathyroid hormone*), hormone parathyroïdienne

PWV (pulse wave velocity), vitesse de l'onde de pouls

RAGE, récepteur des AGEs

RANK (*receptor activator of nuclear factor κB*), récepteur activateur du facteur nucléaire κB

RANKL (*receptor activator of nuclear factor κB ligand*), ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire κB

SHEP, *Systolic Hypertension in the Elderly Program*

SNP, sodium nitroprusside

Syst-China, *Systolic Hypertension in China*

Syst-Eur, *Systolic Hypertension in Europe*

TGF- β (*tumoral growth factor β*), facteur de croissance tumorale de type β

TNF- α (*tumoral necrosis factor α*), facteur de nécrose tumorale de type α

TXA₂, thromboxane A₂

US (*undulation score*), pointage d'ondulation

WVK, association de warfarine et vitamine K₁

Je dédie cette thèse à mes parents, Lise et Abdellah, mon frère, Mounir, et bien entendu mon mari, Jean-François. Merci de votre support inconditionnel et de votre amour.

Remerciements

Réussir des études graduées, et surtout se rendre jusqu'au fil d'arrivée de ce long marathon ne serait pas possible sans le support de plusieurs personnes. C'est pourquoi je tiens à faire les remerciements suivants.

Je tiens tout d'abord à remercier Stéphane Angers, car sans lui je n'aurais jamais su qu'il se fait de la recherche en pharmacologie cardiovasculaire à la Faculté de pharmacie. C'est d'ailleurs lui qui m'a conseillé d'aller rencontrer un certain Pierre Moreau! Je tiens donc à remercier mon cher directeur de recherche, Pierre Moreau. Grâce à lui, mes études graduées furent une expérience des plus enrichissantes, non seulement d'un point de vu scientifique, mais également d'un point de vu humain. Il a su tout au long des 6 dernières années me conseiller, me soutenir et me guider. Il a été à l'écoute non seulement de mes besoins présents, mais aussi futurs, c'est pourquoi il tenait vraiment à ce que j'acquies toutes les compétences nécessaires à ma future carrière. Merci pour tout, et longue vie à ton labo! Je veux également remercier mon co-directeur, le Dr. Marc D. McKee, pour son expertise scientifique et aussi pour avoir pris le temps de réviser mes résumés et articles (même quand je les lui donnais à la dernière minute!!!), thank you! Merci aussi aux Dr. Marc Servant, Daniel Lamontagne, Nobuharu Yamaguchi, Fahima Nekka, Albert Adam, Denis de Blois, et Richard Larivière pour leur expertise et leur aide.

Merci à Louise Ida Grondin pour l'aide technique au cours de toutes ces années. Tu es une vrai perle, j'ai énormément apprécié ton aide, mais aussi ta joie de vivre, tes

anecdotes, nos discussions, que de moments appréciés. Tous mes collègues de laboratoire ont également contribué aux succès de mes études, mais aussi à instaurer une ambiance de travail des plus agréable. Un merci tout spécial à Huy Hao Dao qui m'a supervisé à mon arrivée au laboratoire. J'ai tellement appris grâce à lui, il a su m'inculquer une rigueur scientifique. Merci aussi pour ton amitié et tes blagues plus ou moins douteuses! Merci à Daphné Girardot (c'est toi la championne des cartes!!!), Bénédicte Desmeillers, Chantal Choulak, Pierre Beaucage, Céline Bouvet, Liz-Ann Gilbert, Simon Moreau, Stéphane Maltais, Mario Luc, Marie-Pierre Rousseau, Maarten L. Zandvliet, Yves Semerjian, Vincent Ouellet, Wouter Peeters, Vincent Blouin et Ziad Moulay Lalaoui. Des étudiants de d'autres laboratoires de la Faculté m'ont aussi aidé à divers moment de mes études. Merci à Ester Millette, Simon-Pierre Gravel, Annie Douillette, Annie-Bibeau Poirier, Valérie Chénard, Jean-François Clément et Cyrille Lenoël.

Au cours de mes études graduées, j'ai eu la chance de faire un stage à Seattle dans le laboratoire du Dr. Cecilia M. Giachelli, je la remercie de m'avoir si bien accueillie et de m'avoir permis d'apprendre de nouvelles techniques de laboratoire dans un si bel environnement. Ce stage n'aurait toutefois pas été aussi agréable sans la présence des membres de l'équipe du Dr. Giachelli et plus particulièrement d'Elle Curingua et Laura Pritzker.

Plusieurs employés de soutien de la Faculté de pharmacie m'ont été d'une grande aide. J'en profite pour remercier Andrée Mathieu, Lucie Racine, Gilles De Gagné, Simone Zriel, Leïla Andreos, Monique Leblanc-Odette et Sophie Brisebois.

Je veux également remercier toute ma famille et plus particulièrement mes parents, Lise et Abdellah, mon frère, Mounir, mon mari, Jean-François et ma belle-famille pour leur soutien et leurs encouragements. Sans eux, tout aurait été beaucoup plus difficile. Je vous aime tous très fort.

Finalement, un merci à tous les organismes subventionnaires qui m'ont octroyé des bourses d'étude, c'est-à-dire, le Groupe de recherche sur le système nerveux autonome, Rx&D/Institut de recherche en santé du Canada, les Fonds de recherche en santé du Québec et la Faculté des études supérieures.

Chapitre 1. Introduction

1.1. Hypertension essentielle

La régulation de la pression artérielle est une fonction physiologique très complexe, car elle dépend de l'intégration de plusieurs systèmes : cardiovasculaire, rénal, neuronal et endocrinien. L'hypertension artérielle essentielle (HTAe) représente une élévation anormale de la pression artérielle dont l'origine n'est pas encore identifiée. En effet, le diagnostic de l'HTAe qui s'applique à environ 95% des patients hypertendus, est en fait un diagnostic d'exclusion, c'est-à-dire retenu lorsque toutes les étiologies connues ont pu être éliminées. Il y a donc encore plusieurs incertitudes quant à la physiopathologie de l'HTAe. L'existence d'un déterminisme génétique à l'origine de l'HTAe est depuis longtemps bien admise. Il a été évalué, sur la base d'études de familles et de jumeaux avec ou sans HTAe, qu'environ 30% de la variation interindividuelle de la pression artérielle dans la population générale est déterminée génétiquement [1]. Comme plusieurs mécanismes physiologiques sont impliqués dans le maintien d'une pression artérielle normale, il serait donc logique de croire que plusieurs facteurs (génétiques et environnementaux) peuvent contribuer à l'élévation de la pression artérielle en affectant ces mécanismes. De plus, l'implication relative de ces facteurs peut différer entre les individus.

La pression artérielle se divise en deux composantes : une continue représentée par la pression artérielle moyenne (PAM), et l'autre pulsée (pression pulsée, PP) [2]. La PAM se définit comme suit :

$$PAM = (2PAD + PAS) / 3$$

où la PAD représente la pression artérielle diastolique et la PAS, la pression artérielle systolique. La PAS est la pression maximale atteinte lors de l'éjection ventriculaire, tandis que la PAD est la pression minimale qui survient juste avant une nouvelle éjection ventriculaire. La PAM est influencée par le débit cardiaque et la résistance vasculaire périphérique. La PP, quant à elle, représente la différence entre la PAS et la PAD. Elle est déterminée par l'éjection ventriculaire gauche, les propriétés élastiques des artères de conductance et la réflexion de l'onde pulsatile. La distinction entre les deux composantes de la pression artérielle est importante pour la compréhension de son augmentation. En effet, une élévation de la résistance vasculaire systémique entraîne une augmentation simultanée de la PAD et de la PAS et donc de la PAM. Par contre, une hausse de la rigidité des gros troncs provoque une augmentation de la PAS, mais une légère baisse de la PAD, n'influençant donc pas la PAM (voir Figure 1).

Au début des années 1900, la pression artérielle systolique (PAS) a été utilisée pour définir l'hypertension et décrire les risques associés. Cependant, la pression artérielle diastolique (PAD) n'était pas vraiment considérée, même si on observait son augmentation. Au début des années 1950, la plupart des cliniciens et épidémiologistes ont commencé à tenir compte de la PAD. Ce n'est que vers la fin des années 1950 et le début des années 1960 qu'une étude (*Epidemiologic Pooling Project*, incluant le *Framingham Heart Study*) conclut que la PAD et la PAS contribuent au risque cardiovasculaire, mais que la PAD est

plus pertinente [3]. Par conséquent, la recherche sur l'HTAe s'est attardée à diminuer la PAD. Donc plusieurs études cliniques ont recruté des patients avec une PAD élevée afin de maximiser son traitement. Mais, en 1971, la *Fragmingham Heart Study* démontre clairement que la PAS est plus appropriée que la PAD pour décrire le risque de toutes les complications attribuées à l'HTAe [4]. Toutefois, il faut attendre 1993 et le *Fifth Rapport of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* (JNC V) pour que l'HTAe soit aussi définie en fonction de la PAS [5]. Depuis, ce paradigme a connu un changement radical. En effet, le JNC VI (1997) et le JNC VII (2003) recommandent que la diminution de la PAS soit le but premier des traitements antihypertenseurs [6, 7]. Au cours des deux prochaines sections, je discuterai donc de l'hypertension systolo-diastolique (HSD) et de l'hypertension systolique isolée (HSI).

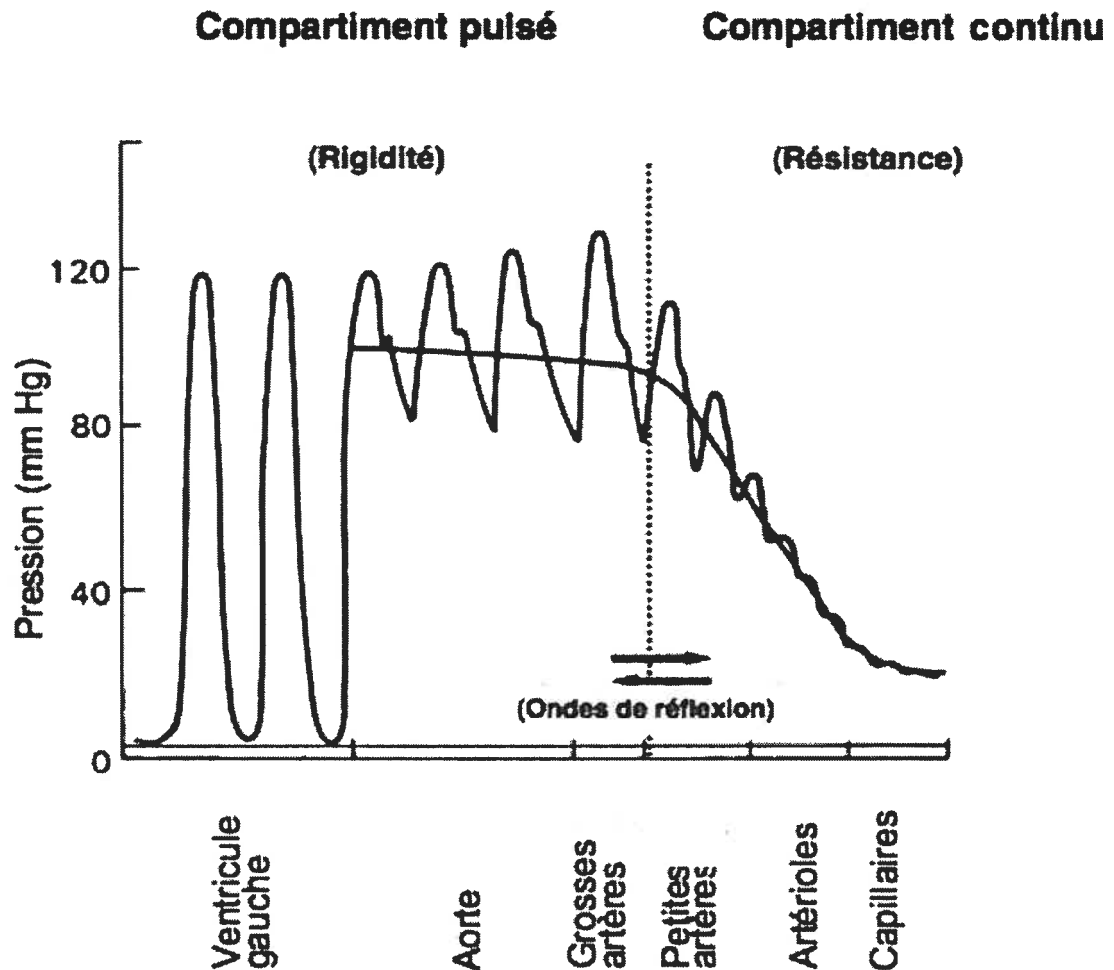


Figure 1. La composante pulsatile et continue de la pression artérielle observée dans le système cardiovasculaire.

Le développement d'une fonction optimale de tamponnage avec une valeur de pression pulsée aortique minimale requiert une valeur donnée de résistance vasculaire et donc de pression artérielle moyenne. La pression artérielle moyenne est déterminée par la topographie et le nombre des segments de résistance qui composent la microcirculation. Les ondes de réflexions sont le dénominateur commun entre les compartiments pulsés et continus de l'arbre artériel. Adapté de Safar et al. 2005, Hypertension [2].

1.1.1. Hypertension systolo-diastolique

a. Définition

Selon la Société canadienne d'hypertension (2001), l'hypertension systolo-diastolique est définie par une PAS égale ou supérieure à 140 mmHg et à une PAD égale ou supérieure à 90 mmHg, mesurées lors de une à cinq visites, avec une moyenne de deux lectures par visite, sur une période de six mois [8]. Dans ce type d'HTAe il y a donc une élévation de la PAM. Comme mentionné précédemment, la PAM est influencée principalement par deux facteurs : 1) le débit cardiaque et 2) la résistance périphérique.

Le débit cardiaque s'élève lorsque la fréquence cardiaque et le volume d'éjection ventriculaire augmentent. La fréquence cardiaque est contrôlée par le nœud sinusal qui est sous l'influence du système nerveux autonome et d'hormones. Le nœud sinusal est innervé par des nerfs parasympathiques qui libèrent l'acétylcholine (ACh), ce qui a pour effet de diminuer la fréquence cardiaque, à l'opposé, les nerfs sympathiques libèrent la noradrénaline ce qui augmente la fréquence cardiaque. De plus, certaines hormones comme l'adrénaline augmentent la fréquence cardiaque en agissant sur les récepteurs β -adrénergique du cœur [9]. Les catécholamines augmentent aussi la force de contraction du myocarde induisant une élévation du volume d'éjection ventriculaire [10].

La résistance périphérique est, quant à elle, principalement contrôlée par les vaisseaux sanguins dits de résistance qui sont les artérioles et les petites artères de moins de

300 μm de diamètre. Ces artères exercent leur rôle via la résistance qu'elles offrent au débit sanguin. Le débit sanguin dépend principalement de la variation de pression entre deux extrémités vasculaires et la résistance. Un physiologiste français qui étudiait le débit d'un liquide dans un tube de verre en est venu à l'élaboration d'une loi (que l'on nomme Poiseuille) mettant en relation la différence de pression, le rayon du tube, la longueur du tube et la viscosité du liquide pour déterminer le débit sanguin [11]. La formule du débit sanguin peut donc être définie par cette équation mathématique :

$$Q = (\Delta P)(\pi r^4) / 8\eta l$$

où ΔP est la différence de pression entre la pression aortique et la pression de la veine cave (à l'entrée de l'oreillette droite), r est le rayon du vaisseau, η la viscosité du sang, l la longueur du vaisseau et 8 une constante de proportionnalité [11]. Ainsi on remarque que le rayon du vaisseau est à la puissance 4 dans la loi de Poiseuille ceci a comme conséquence que la résistance au débit sanguin est grandement déterminée par le diamètre de la lumière interne du vaisseau. Plus le diamètre diminue et plus le vaisseau offre une résistance au débit sanguin. Le diamètre artériel est sous l'influence des propriétés mécaniques passives et actives de l'artère. Les propriétés passives du vaisseau peuvent être décrites comme étant la relation entre le diamètre de la lumière interne et la pression lorsque les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) sont complètement relaxées. Les propriétés actives dépendent du niveau d'activation de chacune des CMLVs et de leur arrangement dans la paroi vasculaire [12].

b. Physiopathologie

La physiopathologie de l'HSD peut donc se définir à partir du débit cardiaque et de la résistance périphérique. Une élévation du débit cardiaque a été observée chez des sujets hypertendus jeunes par rapport à des témoins normotendus ayant le même âge [1]. Si ces jeunes hypertendus sont suivis sur quelques années, on peut observer une normalisation progressive du débit cardiaque compensée par une augmentation de la résistance périphérique, ce qui explique le maintien d'une pression artérielle élevée. Ceci suggère que l'anomalie du débit cardiaque pourrait être le mécanisme initial responsable de l'HTAe à son début; l'augmentation de la résistance périphérique n'étant qu'une adaptation secondaire (dans le cadre d'une autorégulation). L'augmentation du débit cardiaque entraînerait une surperfusion des tissus, provoquant un accroissement proportionnel des résistances locales pour normaliser la perfusion tissulaire [1]. Toutefois cette théorie ne s'applique pas toujours. En effet, cette séquence constituée d'une augmentation initiale du débit cardiaque puis des résistances périphériques n'est pas toujours mise en évidence [1]. De surcroît, il apparaît que l'augmentation des débits locaux est, en fait, corrélée à une augmentation des besoins en oxygène. Finalement, la résistance périphérique n'est jamais normale, car si elle l'est au repos, elle s'élève toujours de façon anormale à l'effort. Donc, l'anomalie initiale serait plutôt une perturbation du contrôle vasomoteur, soit par une hyperactivité des systèmes vasoconstricteurs, soit par un déficit des systèmes vasodilatateurs, soit enfin par une anomalie de la réactivité vasculaire [1]. En fait, il n'existe pas une anomalie unique primitive, mais plutôt des anomalies multiples.

c. Impact sur les organes cibles

L'hypertension n'est pas considérée comme une maladie, mais plutôt comme un facteur de risque important dans l'incidence des maladies cardiovasculaires. En effet, l'hypertension engendre, en premier lieu, un remodelage autant vasculaire que cardiaque. En 1989, Baumbach et Heistad [13] ont démontré que l'hypertension systolo-diastolique peut être associée à un changement de structure des artères de résistance. Il y a une diminution de la lumière et une augmentation du rapport média:lumière sans changement de l'aire de section (*cross sectional area*, CSA). La CSA est un autre paramètre important de la structure du vaisseau, car il donne un indice sur le processus biologique qui détermine la croissance et/ou la régression du matériel de la paroi du vaisseau. Ce remodelage vasculaire se nomme remodelage eutrophique, c'est-à-dire un réarrangement de la même quantité de matière autour d'une lumière plus petite. Il existe aussi un autre type de remodelage dit hypertrophique où cette fois la CSA est augmentée. Il est observé dans l'HTAe, mais au niveau des artères de conductance. Au niveau des artères de résistance, l'hypertrophie est plutôt observée dans les hypertensions dites secondaires, par exemple lorsque l'activité du système rénine-angiotensine est augmentée. Ces deux types de remodelage ont toutefois le même but : normaliser la tension pariétale du vaisseau lorsque la PAM est augmentée. Les modifications dans la géométrie des artères de petit calibre représentent le facteur le plus prévalent, et possiblement le plus précoce, quant au risque de dommages aux organes cibles [14, 15]. De plus, l'hypertension mène à l'hypertrophie du ventricule gauche et contribue de manière considérable aux accidents cérébraux vasculaires

(ACV), aux infarctus du myocarde, à l'insuffisance rénale et cardiaque et à l'athérosclérose. Plusieurs études cliniques ont montré qu'une réduction de seulement 5 à 6 mmHg de la PAD pouvait diminuer de 40 % les chances d'avoir un ACV et de 14 à 17 % de faire un infarctus du myocarde [16]. Il a donc été établi qu'il est important de diminuer la PAD afin de réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires. Plusieurs classes d'antihypertenseurs ont alors été développées afin de diminuer la volémie, la résistance périphérique et le débit cardiaque afin de réduire la PAD et la PAM.

d. Antihypertenseurs

Les diurétiques

La première classe d'antihypertenseurs à avoir été utilisée pour traiter l'hypertension systolo-diastolique fut les diurétiques. Les diurétiques de type thiazidiques ont des effets aigus et chroniques sur la pression artérielle. Dans un premier temps, sous l'effet de la déplétion volémique initiale, les volumes sanguins et extracellulaires diminuent, entraînant une réduction du débit cardiaque qui provoque un abaissement de la pression artérielle. Dans un second temps, la volémie augmente à nouveau, mais sans toutefois atteindre les niveaux antérieurs, c'est alors la diminution de la résistance périphérique qui permet de maintenir la diminution de pression artérielle [17].

Les β -bloquants

Réservés initialement au traitement de fond de l'angor et de certains troubles de rythme, les β -bloquants ont vu rapidement leurs indications s'élargir au traitement de

l'hypertension. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action antihypertensive des β -bloquants. En traitement aigu, les β -bloquants diminuent le débit cardiaque, mais augmentent la résistance périphérique, ce qui fait que la pression artérielle ne varie pas. Toutefois, en administration chronique, le débit reste abaissé et la résistance périphérique diminue progressivement, entraînant la baisse de pression. Certains β -bloquants, comme le labétolol, le pindolol et l'acébutolol, possèdent une activité sympathomimétique intrinsèque abaissant peu le débit cardiaque, mais entraînant d'emblée une diminution de la résistance périphérique (effet vasodilatateur par l'activation partielle des récepteurs β en absence de catécholamines). De plus, les β -bloquants engendrent une augmentation de sensibilité des barorécepteurs: le baroréflexe sympathique serait plus facilement mis en jeu permettant ainsi une régulation de la pression artérielle à un niveau moindre. Cette classe d'antihypertenseur entraîne également une réduction de la sécrétion de rénine et une action centrale, c'est-à-dire une diminution l'efflux nerveux sympathique des centres vasomoteurs du cerveau (en fait seuls les β -bloquants liposolubles passent la barrière hémato-encéphalique). Finalement, il existe au niveau de la terminaison des fibres sympathiques postganglionnaires des récepteurs β_2 sensibles aux catécholamines circulantes et, en particulier, à l'adrénaline dont la stimulation majeure la quantité de noradrénaline libérée sous l'influence de l'influx nerveux sympathique. En bloquant les récepteurs β_2 sensibles aux catécholamines, les β -bloquants peuvent réduire cette libération périphérique de noradrénaline [18].

Les α -bloquants

Les α -bloquants sont aussi une classe de médicaments utilisés pour réduire la pression artérielle. La prazosine fut le premier α -bloquant mis sur le marché aux Etats-Unis. Elle lie préférentiellement les récepteurs adrénergiques α_1 ($\alpha_1 \gg \alpha_2$) sur les muscles lisses vasculaires inhibant l'effet vasoconstricteur de la noradrénaline. Ceci provoque une relaxation des vaisseaux sanguins et plus spécifiquement des artères de résistance et des artérioles. Par conséquent, la pression artérielle diminue avec la baisse de la résistance périphérique. Les α -bloquants ne sont toutefois pas donnés en première ligne de traitement pour l'HTAe, ils sont même contre-indiqués en monothérapie chez les patients hypertendus, lorsqu'il n'y a pas d'autres indications pour les utiliser. En effet, l'étude ALLHAT (*Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial*) a montré que l'utilisation d'un α -bloquant comparativement à un diurétique engendrait un risque accru d'AVCs et d'insuffisance cardiaque [19].

Les antagonistes non sélectifs inhibent également les récepteurs α_2 présynaptiques. Ces récepteurs ont pour rôle de diminuer la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques lorsqu'elles sont stimulées, engendrant plusieurs effets secondaires très néfastes comme la syncope, l'hypotension orthostatique et la tachycardie. C'est pourquoi les α -bloquants non sélectifs ont été largement abandonnés [18].

Il existe aussi des α,β -bloquants qui diminuent la pression artérielle en diminuant le rythme cardiaque et sa force contractile (comme des β -bloquants purs), mais qui via leur

effet inhibiteur sur les récepteurs α_1 adrénergiques réduisent également la résistance périphérique [20].

Les bloqueurs du système rénine-angiotensine

Une autre approche utilisée pour traiter l'hypertension est l'intervention sur le système rénine-angiotensine. L'angiotensine II (Ang II) augmente la pression artérielle via ses actions vasoconstrictrices directes et indirectes. En outre, elle présente des actions trophiques sur le cœur et les vaisseaux sanguins menant à l'hypertrophie de ces derniers. Il existe actuellement deux classes de médicaments qui antagonisent ce système, soit les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et les antagonistes des récepteurs AT_1 de l'Ang II (ARA).

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est pluripotente, car elle peut catalyser la conversion de l'Ang I en Ang II et dégrader la bradykinine (BK), un vasodilatateur, ainsi que d'autres peptides vasoactifs. Même si les IECA diminuent la conversion de l'Ang I en Ang II, ils ne peuvent réduire la production d'Ang II par des voies indépendantes de l'ECA (chymases et autres protéases). Puisque les IECA induisent seulement une baisse transitoire (durant quelques jours à quelques semaines) des niveaux d'Ang II, d'autres mécanismes ont donc été considérés pour expliquer la baisse de pression artérielle observée en chronique par cette classe d'agents antihypertenseurs. Comme l'ECA est identique à la kininase II, enzyme qui dégrade la BK, les IECA devraient augmenter les taux tissulaires de la BK. La BK est connue pour stimuler la production de monoxyde

d'azote et la relâche de prostacycline provoquant une diminution de la résistance périphérique et par conséquent de la pression artérielle [21].

Les ARA bloquent spécifiquement les récepteurs AT_1 de l'Ang II. À ce jour, quatre récepteurs de l'Ang II ont été identifiés : AT_1 , AT_2 , AT_3 et AT_4 , toutefois seuls les deux premiers ont bien été caractérisés. Le récepteur AT_1 induit la plupart des actions physiologiques connues de l'Ang II, c'est-à-dire la vasoconstriction et la croissance cellulaire. Par contre, le récepteur AT_2 , exprimé surtout lors du développement et suite à des traumatismes, semble induire une vasodilatation et de l'apoptose qui engendre des effets inhibiteurs sur la croissance cellulaire. De plus, la stimulation du récepteur AT_2 par l'Ang II peut augmenter la production de monoxyde d'azote (NO, vasodilatateur). Parce que durant l'administration d'ARA les taux circulants d'Ang II augmentent, il est probable que cet antihypertenseur diminue la pression artérielle de deux manières : en bloquant la vasoconstriction induite par les récepteurs AT_1 et en activant les récepteurs AT_2 (qui eux induisent une vasodilatation) potentialisant ainsi la diminution de la résistance périphérique [22].

Les bloqueurs des canaux calciques

Les bloqueurs des canaux calciques (BCC) sont aussi largement utilisés pour traiter l'hypertension systolo-diastolique. On peut distinguer deux types de BCC, soit ceux dérivés de dihydropyridines et les non dihydropyridines. Les BCCs de type dihydropyridine exercent leurs effets cliniques en bloquant les canaux calciques voltage-dépendant de type

L. Il est important de comprendre que pour se contracter, les CMLVs doivent augmenter leur concentration cytoplasmique de calcium ionisé, qui au repos est très faible. C'est via les canaux calciques que le calcium peut entrer dans la cellule, ce qui mènera à la contraction de la cellule. Ainsi les dihydropiridines induisent une vasodilatation, surtout des artéioles responsables de la résistance périphérique, ce qui abaisse la pression artérielle. De surcroît, les BCCs bloquent les effets de l'Ang II et des récepteurs adrénergiques α_1 et α_2 vasoconstricteurs [23]. Les BCCs non dihydropiridines en plus de diminuer la résistance périphérique, peuvent également diminuer la conduction électrique du cœur et tendent à réduire la fréquence cardiaque [24].

Les vasodilatateurs directs

Certains agents comme l'hydralazine et le minoxidil peuvent induire une vasodilatation des artères de résistance. L'action hypotensive de l'hydralazine est due à un blocage des récepteurs adrénergiques, et une inhibition des centres diencephaliques. Le minoxidil, lui, active les canaux potassiques des CMLVs. Ces agents sont surtout utilisés pour traiter des hypertensions sévères ou réfractaires. Par contre, à cause d'un réflexe sympathique, de l'activation du système rénine-angiotensine et d'une rétention sodée, ces médicaments doivent être administrés avec d'autres antihypertenseurs comme les β -bloquants et les diurétiques [25].

1.1.2. Hypertension systolique isolée

a. Définition et prévalence

L'hypertension systolique isolée (HSI) est définie par une PAS égale ou supérieure à 140 mmHg et à une PAD égale ou inférieure à 90 mmHg. Ainsi la pression pulsée (PP), qui est la différence entre la PAS et la PAD, est augmentée, tandis que la PAM reste inchangée. Des études de population ont montré que la PAS et la PAD augmentent avec l'âge. Toutefois, la PAD diminue après l'âge 50 ans [26] (voir Figure 2), c'est pourquoi la prévalence de l'HSI augmente avec l'âge. L'HSI est la forme d'HTAe prédominante chez les gens âgés de plus de 65 ans, elle atteint 34% des hommes et 43% des femmes âgés entre 65 et 74 ans. En raison du vieillissement de la population nord-américaine, le traitement de cette forme d'HTAe représente un défi de taille. Effectivement, le contrôle de la PAS est beaucoup plus difficile à obtenir que celui de la PAD avec les traitements actuels [27]. Une étude belge a d'ailleurs montré que la pression artérielle a pu être contrôlée chez 25% des patients atteints d'hypertension systolo-diastolique contre seulement 13% des patients atteints d'HSI [28]. Ces derniers étaient, pour la plupart (plus de 50%), traités avec des diurétiques et/ou des BCC.

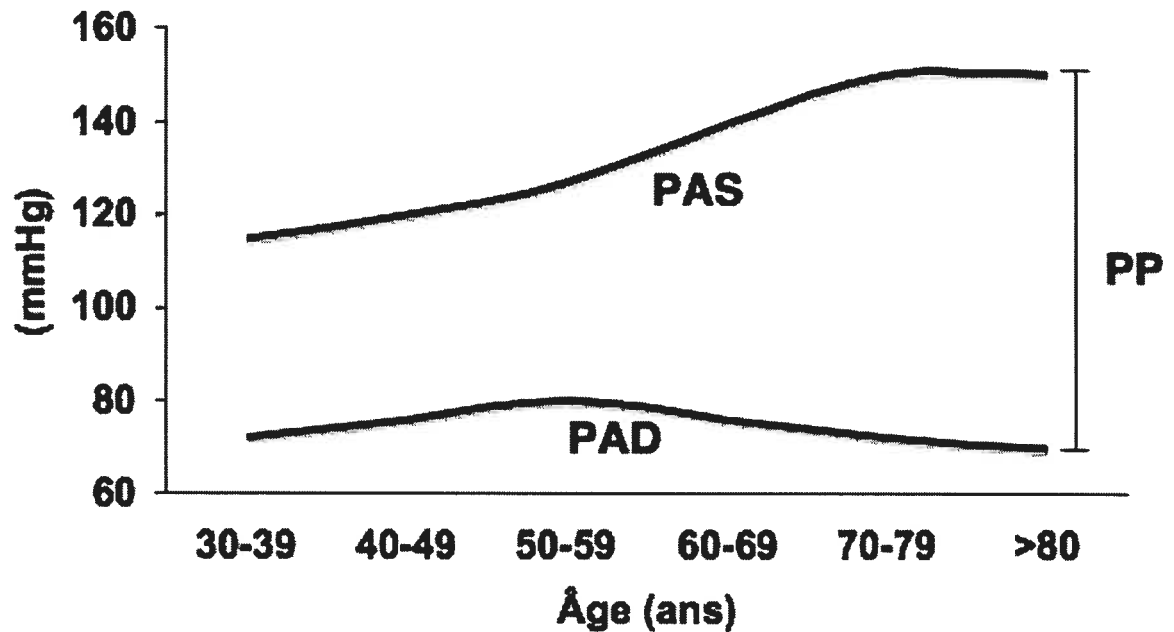


Figure 2. Évolution de la pression artérielle systolique, diastolique et pulsée au cours du vieillissement.

La PAS et la PAD augmentent avec l'âge, toutefois, après 50 ans la PAD diminue entraînant une élévation de la PP. Adapté de Staessen et al. 1990, J Hypertens [26].

Abbreviations

PAS, pression artérielle systolique; PAD, pression artérielle diastolique; PP, pression pulsée.

b. Physiopathologie

La PP est influencée par la compliance artérielle, l'éjection ventriculaire et la réflexion de l'onde pulsatile. La compliance artérielle est définie comme étant le changement de diamètre de l'artère pour un saut de pression donné (voir Tableau 1). La compliance artérielle et la vitesse de l'onde de pouls reflètent l'élasticité ou à l'opposé la rigidité d'une artère (pour définition voir Tableau 1). Notons que la vitesse de l'onde de pouls aortique double, tandis que le coefficient de distensibilité de l'aorte diminue de moitié entre l'âge de 20 et 70 ans [29]. L'onde pulsatile est composée de 2 ondes; l'une générée par le cœur, se propageant vers les sites périphériques; l'autre, nommée onde de réflexion, retournant vers le cœur, en provenance de la périphérie. Chez les jeunes adultes en santé, l'onde de réflexion coïncide avec la diastole, ce qui augmente la PAD et potentialise la perfusion coronaire. Par contre, lorsque que les parois artérielles se durcissent, comme lors du vieillissement, l'onde initiale se propage plus rapidement. Par conséquent, l'onde de réflexion atteint l'aorte en fin de systole. Ainsi la PAS augmente, tandis que la PAD diminue ce qui cause une élévation de la PP et le développement de l'HSI.

Même si la PAM reste relativement constante tout au long de l'arbre artériel, la PP tend à augmenter plus on s'éloigne du cœur et ce à cause de la sommation des ondes générées par le cœur et des ondes de réflexion à chaque point de l'arbre artériel. En effet, chez les jeunes gens en santé, il n'est pas rare d'observer que la PP brachiale est plus élevée

de 15 à 20 mm Hg par rapport à celle de l'aorte thoracique. Par contre, chez des sujets plus âgés, à cause de la propagation plus rapide des ondes de pression, l'amplification de la PP disparaît (voir Figure 3) [30].

La rigidité artérielle peut être augmentée par plusieurs facteurs : l'augmentation du matériel rigide comme le collagène dans la paroi vasculaire, la fragmentation des filaments élastiques et leur calcification ou élastocalcinose et la création de ponts intermoléculaires entre les protéines matricielles. Je reviendrai d'ailleurs en détail sur ces différents facteurs en m'attardant particulièrement sur l'élastocalcinose dans des sections subséquentes de l'introduction.

Âge et amplification de la PP

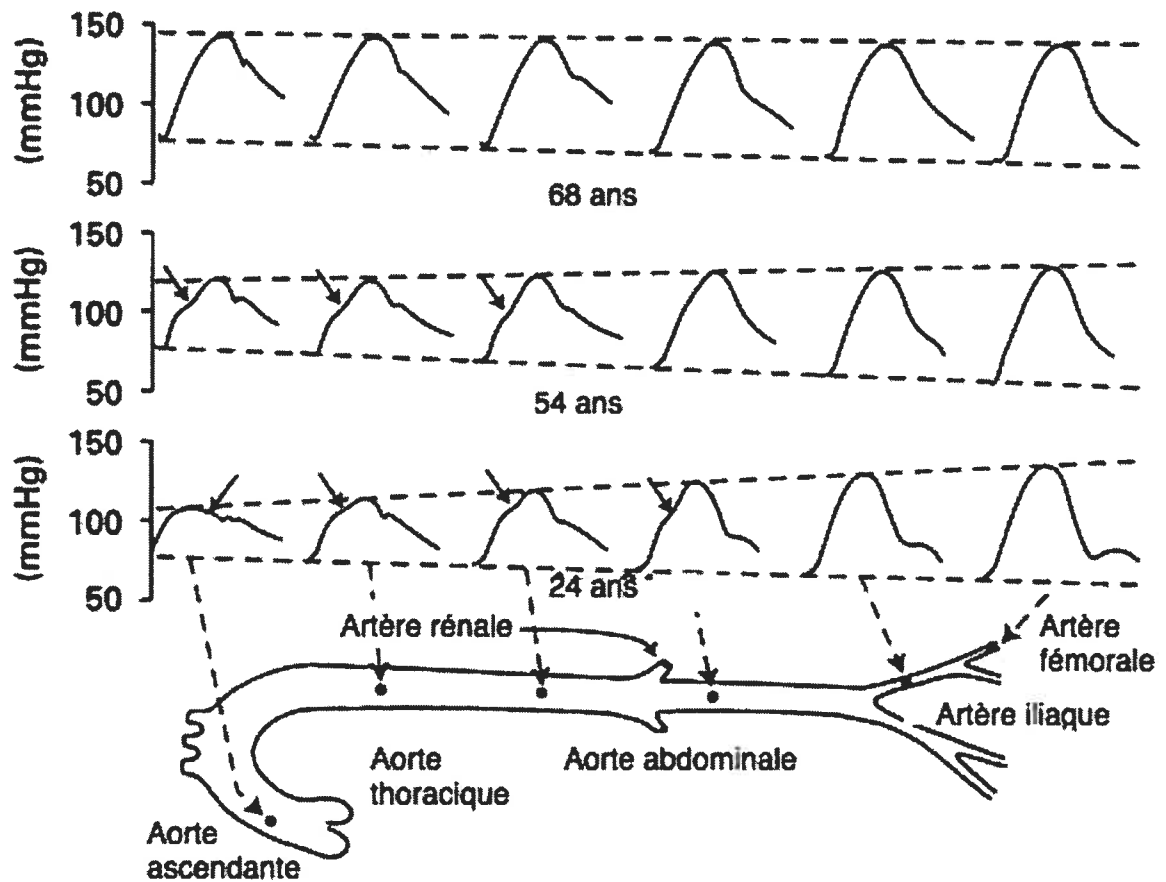


Figure 3. Propagation de la pression pulsée (PP) de l'aorte ascendante vers les artères périphériques à différents âges chez l'homme.

Chez les sujets plus jeunes (24 ans), la vitesse de propagation est relativement lente dans les artères. À cause de la sommation des ondes qui vont vers la périphérie et les ondes de réflexion à chaque point de l'arbre artériel, la PAS augmente beaucoup de l'aorte ascendante à l'artère fémorale, tandis que la PAD tend à diminuer et la PAM reste inchangée. Chez les sujets plus âgés (68 ans), comme la vitesse de propagation des ondes de pression est plus rapide, l'amplification de la PP disparaît, ce qui a pour conséquence que la PAS et la PAD restent identiques tout au long de l'arbre artériel. À l'âge de 54 ans on observe une situation intermédiaire. Adapté de Safar et al. 2003, Am J Physiol Heart Circ Physiol [30].

c. Impact sur les organes cibles

L'hypertension systolique isolée est fortement associée à l'augmentation des risques cardiovasculaires et ce de manière plus importante que l'hypertension systolo-diastolique [31]. D'ailleurs la PP est un facteur de risque important quant à la morbidité et la mortalité cardiovasculaires [32]. Tout comme l'hypertension systolo-diastolique, l'HSI induit un remodelage vasculaire et cardiaque. En effet, Dao et al. ont démontré, dans un modèle d'HSI chez le rat, que l'élévation de la PP entraîne un remodelage hypertrophique des petites artères cérébrales [33]. De plus, des patients atteints d'HSI présentaient une augmentation plus importante de la CSA des carotides, donc une plus grande hypertrophie, que des patients atteints d'hypertension systolo-diastolique [34]. Cette étude démontrait aussi une hypertrophie du ventricule gauche plus marquée chez ces patients. De plus, parmi toutes les valeurs de pression artérielle, seule la PP serait un facteur de risque indépendant pour le remodelage cardiovasculaire. D'ailleurs, la PP représenterait un déterminant clé du risque cardiovasculaire [35]. Ce qui par conséquent mène à une plus forte prévalence d'atteintes aux organes cibles (accident cérébral vasculaire, insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde, athérosclérose) chez les patients atteints d'HSI.

d. Études cliniques et traitements

Au cours des dernières années, quelques études cliniques randomisées enrôlant des patients âgés atteints d'HSI ont été réalisées. Tout d'abord, l'étude SHEP (Systolic Hypertension in the Elderly Program) est composée d'une cohorte de 4736 patients âgés de

plus de 60 ans avec une PAS plus grande que 160 mmHg et une PAD plus petite que 90 mmHg [36]. Les patients traités avec le diurétique chlorthalidone (12,5 mg/jour) ont été comparés à ceux du groupe placebo. Lorsque les patients ne répondaient pas au traitement initial, la dose du diurétique fut doublée et un autre antihypertenseur comme l'atenolol (β -bloquant) ou la réserpine (diminue la biosynthèse de la noradrénaline) furent ajoutés au diurétique. Le but premier de cette étude était de vérifier l'efficacité du traitement sur l'incidence des ACV, même si l'incidence des événements coronariens et cardiovasculaires a aussi été mesurée. Ensuite, l'étude Syst-Eur (Systolic Hypertension in Europe) a enrôlé 4695 patients âgés de 60 ans et plus avec une PAS entre 160 et 219 mmHg et une PAD en dessous de 95 mmHg [37]. Cette fois, le BCC nitrendipine (10 à 40 mg/jour) a été donné en traitement initial afin de le comparer avec un placebo. Ce BCC a été jumelé ou remplacé par l'énalapril (IECA) ou l'hydrochlorthiazide (diurétique) si nécessaire. Cette fois, l'effet du traitement sur la mort provoquée par un événement cardiovasculaire, un ACV ou un infarctus du myocarde a été étudié. Une étude avec les mêmes critères d'inclusion a été réalisée en Chine (Syst-China) avec une cohorte de 2394 patients [38]. Mais cette fois, l'IECA administré (si nécessaire) fut le captopril au lieu de l'énalapril. Finalement l'étude LIFE (Losartan Intervention for Endpoint Reduction) [39] a enrôlé 9222 patients âgés entre 55 et 80 ans, incluant 1326 patients avec une HSI (une PAS entre 160 et 200 mmHg et une PAD plus petite que 90 mmHg). Cette étude avait pour but de comparer l'effet d'un antagoniste des récepteurs AT_1 de l'Ang II, le losartan (50 à 100 mg/jour), et un β -bloquant, l'aténolol (50 à 100 mg/jour), sur l'incidence de la mort provoquée par un

événement cardiovasculaire, des ACV ou des infarctus du myocarde. L'administration de l'hydrochlorothiazide comme deuxième agent ou même de d'autres antihypertenseurs ont été permis pour normaliser la pression artérielle (140/90 mmHg).

Tableau 1. Sommaire des études cliniques sur l'hypertension systolique isolée.

Étude	n (patients)	Âge des patients (ans)	PAS / PAD initiales (mmHg)	Traitement initial et comparaison
SHEP	4736	> 60	> 160 / < 90	Chlorthalidone vs placebo
Syst-Eur	4695	≥ 60	160 à 219 / < 95	Nitrendipine vs placebo
Syst-China	2394	≥ 60	160 à 219 / < 95	Nitrendipine vs placebo
LIFE	1326 (avec HSI)	55 à 80	160 à 200 / < 90	Losartan vs Aténolol

Abbreviations : SHEP, Systolic Hypertension in the Elderly Program; Syst-Eur, Systolic Hypertension in Europe; Syst-China, Systolic Hypertension in China; LIFE, Losartan Intervention for Endpoint Reduction; PAS, pression artérielle systolique; PAD, Pression artérielle diastolique.

Dans les études SHEP, Syst-Eur et Syst-China, les traitements actifs ont tous permis de réduire la pression artérielle (en moyenne de 9 à 11/3 à 5 mmHg) comparativement au placebo. La baisse de pression artérielle est plus importante dans l'étude LIFE (28/9 mmHg dans les deux groupes), mais il n'y avait pas de groupe placebo. Actuellement, chez les patients âgés, les recommandations officielles suggèrent de réduire la pression artérielle en dessous de 140/90 mmHg. Ce but est très difficile à atteindre en monothérapie, c'est pourquoi il est souvent nécessaire d'administrer plusieurs drogues à un patient. Toutefois, cette « pluri-thérapie » entraîne plus d'effets secondaires et diminue l'observance des

patients. Dans l'étude LIFE, 44,4% et 42,9% des patients traités avec le losartan et l'aténolol respectivement ont atteint cet objectif. Cependant, pour atteindre ces résultats, la coadministration d'au moins deux agents antihypertenseurs a été nécessaire chez 62,5% des patients dans le groupe losartan et 57,7% dans ceux du groupe aténolol.

Dans l'étude SHEP, le traitement actif a permis de diminuer de 36% l'incidence des ACVs. Néanmoins, le taux d'ACVs fatals ne différait pas entre le groupe traité avec le diurétique et celui traité avec le placebo. Ainsi, l'effet bénéfique du traitement provient de la diminution des ACVs non fatals. Les mêmes résultats ont été observés dans l'étude Syst-Eur, c'est-à-dire une diminution significative de 42% des ACVs par le traitement actif, dû principalement à la diminution des ACVs non fatals. Les résultats sont toutefois différents dans l'étude Syst-China où la diminution significative des ACVs (-44%) est due à la baisse des ACVs fatals (-38%, $P < 0.01$) (voir Figure 4). Pour ce qui est de l'étude LIFE, le losartan a permis de réduire de 40% ($p < 0.02$) l'incidence des ACVs par rapport à l'aténolol même si les deux traitements avaient permis une baisse similaire de pression artérielle.

Le traitement actif dans l'étude SHEP a permis de diminuer le taux des infarctus du myocarde non fatals ou des événements coronariens fatals de 27%. Cependant, cet effet protecteur est significatif seulement chez les patients présentant des anomalies de leur électrocardiogramme de base. Dans l'étude Syst-Eur, l'incidence totale des infarctus du myocarde fatals et non fatals est plus basse dans le groupe avec le traitement actif (-30%), mais cette diminution n'est pas significative par rapport au groupe placebo ($P = 0.12$). Par

contre, dans l'étude Syst-China, l'incidence de tous les infarctus du myocarde entre le groupe traité et le groupe placebo reste inchangée avec même un avantage de 6% pour le groupe placebo (voir Figure 4). Ce résultat pourrait s'expliquer par les taux de cholestérol totaux inférieurs dans l'étude Syst-China par rapport à ceux observés dans les études effectuées en Amérique de Nord et en Europe. L'hypercholestérolémie étant un facteur de risque important pour les événements coronariens, les patients chinois seraient, à la base, moins susceptibles de développer un infarctus du myocarde. Il est alors plus difficile de démontrer un impact positif sur ce paramètre. Les patients de l'étude LIFE sont tous à haut risque de développer un infarctus du myocarde, car ils présentent tous une hypertrophie du ventricule gauche. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux traitements sur le taux d'infarctus du myocarde et d'hospitalisation due à de l'angine de poitrine, à une revascularisation coronarienne ou à un arrêt cardiaque. Par contre, le losartan a permis une plus grande régression de la masse du ventricule gauche que l'aténolol ($P < 0.001$).

Les traitements antihypertenseurs ont diminué l'incidence de la mortalité induite par toutes les causes (ACV, événements cardiovasculaires et coronariens) de 13 % et 14% dans les études SHEP et Syst-Eur, respectivement, mais cet effet est non significatif. Par contre, dans l'étude Syst-China, cette réduction est de 39% ($P = 0.003$) (voir Figure 4). Dans l'étude LIFE, le losartan a diminué de 28% la mortalité comparativement à l'aténolol ($p = 0.04$). Les traitements des études SHEP et Syst-Eur n'ont encore pas pu diminuer significativement la mort causée par un événement cardiovasculaire, alors qu'une diminution significative de

39% a été observée dans l'étude Syst-China. Dans l'étude LIFE, la différence de l'incidence de la mortalité causée par un événement cardiovasculaire entre le groupe losartan et aténolol est significative (-46% en faveur du losartan).

À ce jour, les antihypertenseurs donnés initialement pour traiter l'HSI sont les diurétiques et les BCCs de type dihydropyridine [8]. Ces traitements ne sont toutefois pas optimaux. En effet, ces deux classes d'antihypertenseurs ont été développées d'abord pour baisser la PAM et la PAD en diminuant la résistance périphérique et non pour réduire la rigidité des artères de conductance, cause première du développement de l'HSI (augmentation de la PAS et de la PP). À ce propos, une analyse post-hoc des données de l'étude SHEP a montré qu'une réduction excessive de la PAD peut avoir des répercussions cliniques nuisibles, car c'est en diastole que la perfusion coronaire s'effectue de manière prédominante [40]. Il est donc important de développer des traitements qui cibleraient principalement la réduction de la PAS en diminuant la rigidité des gros troncs. La compréhension des mécanismes qui causent l'augmentation de la rigidité artérielle dans le vieillissement et dans certaines pathologies comme le diabète et l'insuffisance rénale, est alors importante pour le développement de traitements antihypertenseurs efficaces dans le contexte de l'HSI. Au cours des prochaines sections, je me concentrerai donc sur la structure et la fonction des artères de conductance. En outre, j'examinerai les altérations subies lors du vieillissement, en particulier la calcification médiale ou élastocalcinose, qui mène à une augmentation de la rigidité de ces artères et à l'HSI.

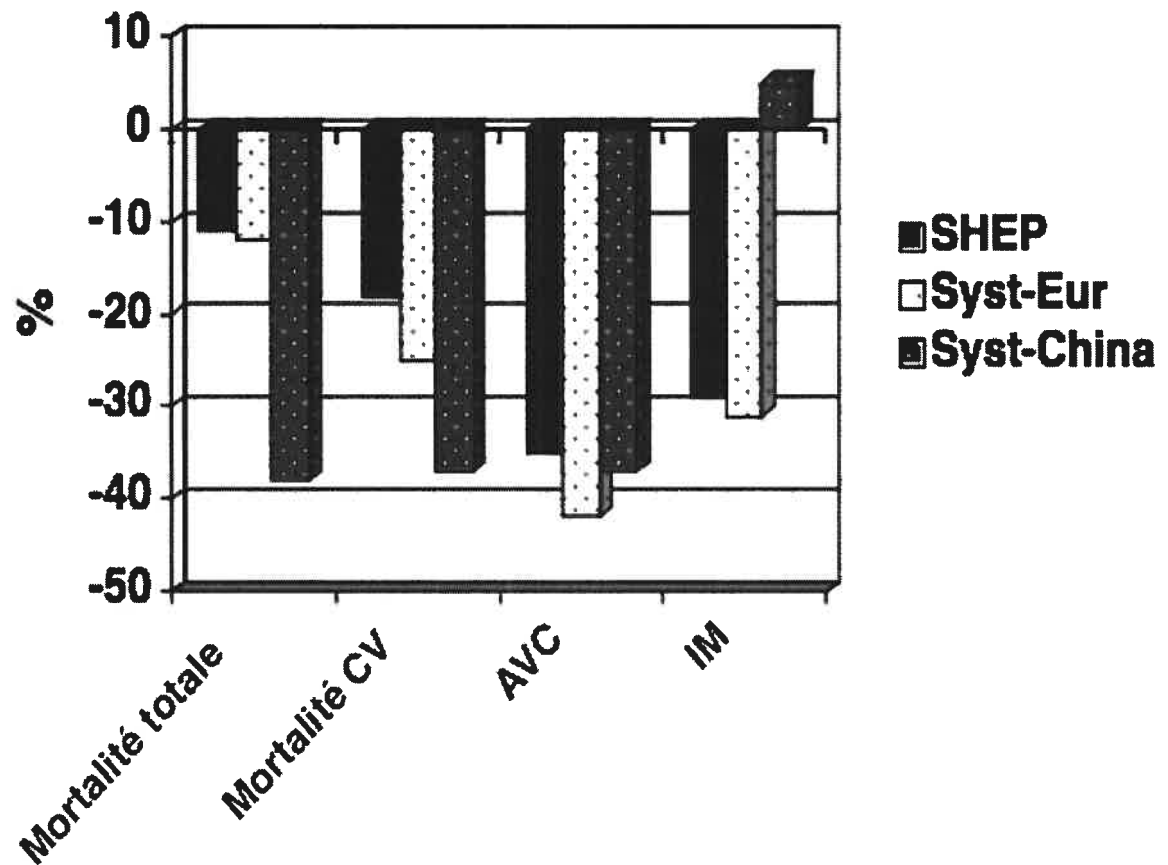


Figure 4. Diminution (en %) de la mortalité totale et cardiovasculaire (CV), des accidents vasculaires cérébraux (ACV) et des infarctus du myocarde (IM) observée dans différentes études cliniques sur le traitement de l'hypertension systolique isolée.

Abbreviations

SHEP, *Systolic Hypertension in the Elderly Program*; Syst-Eur, *Systolic Hypertension in Europe*; Syst-China, *Systolic Hypertension in China*.

Adapté de Waeber, 2003, *Current Cardiology Reports* [41].

1.2. Les artères de conductance

1.2.1. Structure et fonction

Les artères de conductance appelées aussi artères élastiques ou grosses artères comprennent l'aorte, les carotides, les artères sous-clavière et brachiocéphalique [42]. Ces artères sont composées de trois couches distinctes : l'intima, la média et l'adventice. L'intima est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales, nommée endothélium, supportée par une membrane basale riche en collagène. L'endothélium est situé à l'interface entre le sang et la paroi vasculaire (média). La média est principalement composée d'un ensemble intégré de cellules du muscle lisse vasculaire (CMLVs), de lamelles élastiques (élastine) et de fibrilles de collagène [43]. Enfin, l'adventice est composée majoritairement de fibroblastes et de collagène (voir Figure 5).

Ces artères de gros calibre ont pour rôle de conduire le sang du cœur vers les vaisseaux périphériques en amortissant le signal pulsé du cœur pour assurer un débit continu au niveau des tissus. Pour ce faire, les propriétés élastiques des artères de conductance sont très importantes. En effet, lors de l'éjection ventriculaire du sang, ces artères s'élargissent, grâce à leur élasticité, pour absorber cette poussée, puis reprennent leur forme originale afin de projeter le sang vers les vaisseaux périphériques lors de la relaxation cardiaque (voir Figure 6). Ce concept est souvent relié au modèle de Windkessel [42].

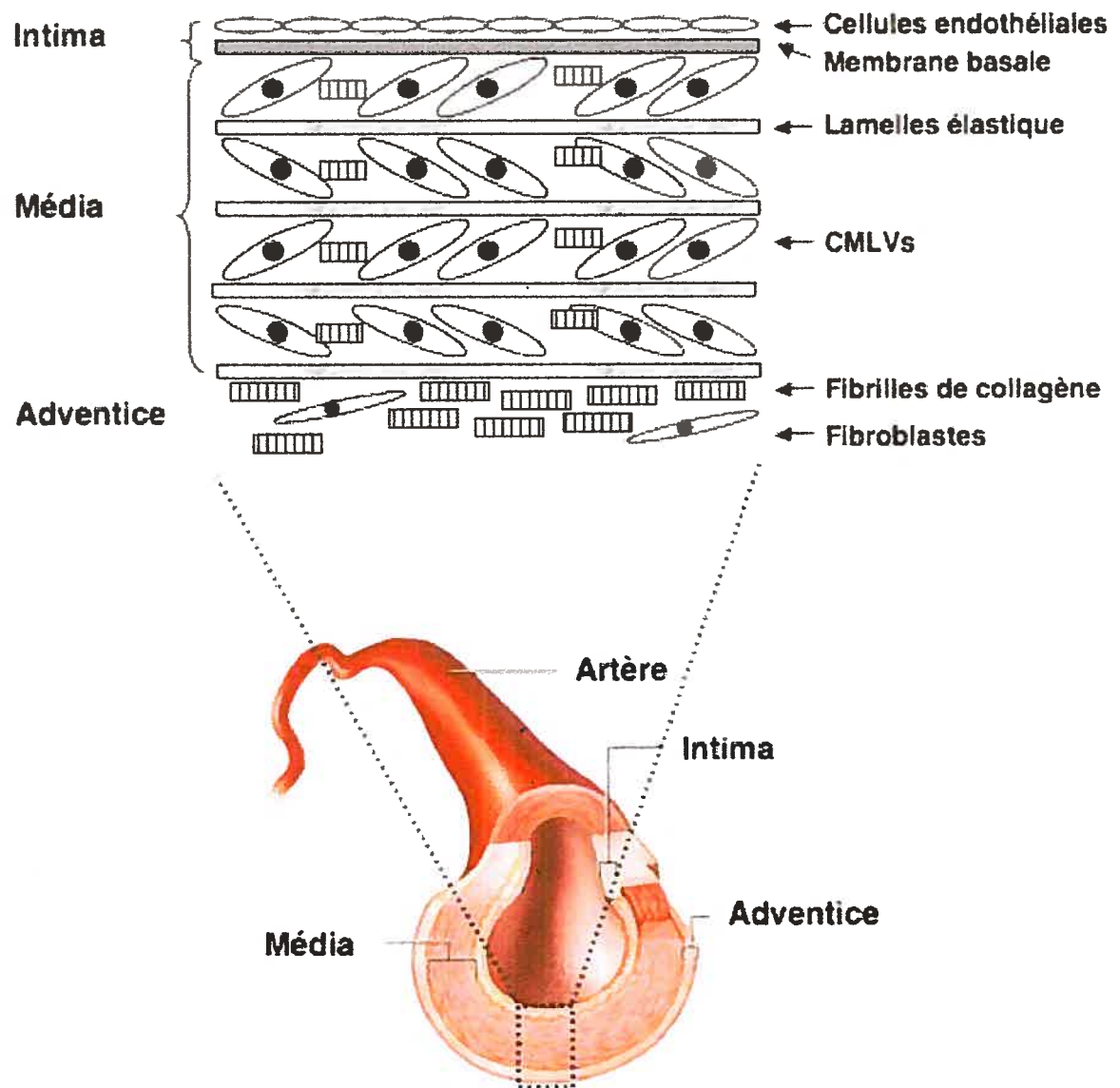


Figure 5. Représentation schématique de la composition de la paroi vasculaire.

De l'intérieur vers l'extérieur, l'artère est composée de trois couches : l'intima, la média et l'adventice. La monocouche de cellules endothéliales et la membrane basale élastique composent l'intima, tandis que les CMLVs, les lamelles élastiques et les fibrilles de collagène forment la média. Dans l'adventice on retrouve principalement des fibroblastes et de fibrilles de collagène. Adapté de Jacob et al. 2003, Biomedicine & Pharmacotherapy [44].

Abbréviation

CMLV, cellule du muscle lisse vasculaire.

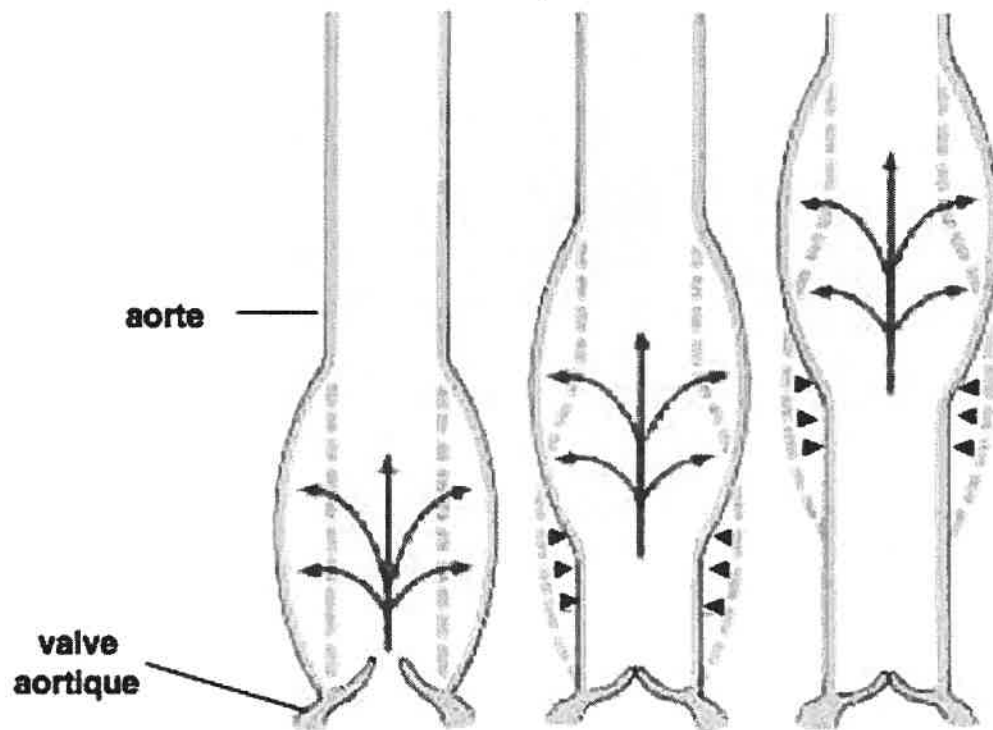


Figure 6. Illustration de la fonction de tamponnage de l'aorte nécessaire à produire un débit sanguin continu.

L'aorte, grâce à ses propriétés élastiques, s'étire lorsque le sang est éjecté du coeur et reprend sa forme afin de pousser le sang un peu plus vers l'avant afin de créer un débit sanguin continu.

a. Endothélium

L'endothélium vasculaire n'est pas seulement une barrière physiologique entre le sang et les CMLVs, il synthétise et libère différents facteurs biologiquement actifs, antithrombotiques et régulant le tonus vasculaire et l'homéostasie cellulaire. En 1976, Moncada et al. ont montré que la prostacycline (PGI_2), un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, était produit par les cellules endothéliales [45] conférant à l'endothélium son rôle antithrombotique. En 1980, Furchgott et Zawadzki ont découvert la production d'un puissant facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) en réponse à l'ACh [46]. Le NO a ensuite été identifié comme étant un des principaux EDRF [47]. Dans les cellules endothéliales, le NO est formé à partir d'une réaction entre la L-arginine et l'oxygène moléculaire catalysée par une NO synthétase (NOS). Il existe trois isoformes de la NOS : endothéliale (eNOS), inductible (iNOS) et neuronale (nNOS). Les cellules endothéliales produisent d'autres agents vasorelaxants tels que la PGI_2 et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Pour contrebalancer l'effet vasorelaxant de ces agents sur les CMLVs, l'endothélium synthétise aussi des facteurs vasoconstricteurs comme la tromboxane A_2 (TXA_2), la prostaglandine H_2 (PGH_2), mais surtout l'endothéline, qui constitue le principal agent constricteur [48, 49] (voir Figure 7). En situation physiologique, afin de maintenir un tonus vasculaire adéquat, il se crée un équilibre entre la synthèse des facteurs relaxants et constricteurs dérivés de l'endothélium. Au niveau des artères de conductances, ces agents relaxants et constricteurs n'affectent pas vraiment le diamètre du vaisseau, contrairement à ce qu'on observe dans les artères de résistance.

Plus récemment, des études semblent suggérer que l'endothélium peut également jouer un rôle au niveau de la compliance des artères de conductance. Fitch et al. ont montré chez le rat qu'une inhibition aiguë et chronique de la NOS par le L-NAME augmentait la rigidité aortique (mesurée par la vitesse de l'onde de pouls) [50]. D'ailleurs, lorsque l'aorte est dénudée de son endothélium chez le rat, la compliance de cette artère est altérée [51]. De plus, chez les patients atteints de maladies des artères périphériques, la stimulation systémique de la synthèse de NO diminue la vitesse de l'onde de pouls de l'aorte, suggérant une plus grande compliance de ce gros tronc [52]. Il semble qu'à ce jour, peu d'études se sont intéressées à l'effet du NO et des facteurs dérivés de l'endothélium sur la structure et la fonction des grosses artères [53]. L'ET semble également avoir un effet sur la rigidité des gros troncs. Une étude menée chez des patients atteints de maladies coronariennes a montré que les taux d'ET plasmatique étaient corrélés significativement avec un indice de rigidité aortique, c'est-à-dire, que plus la concentration d'ET-1 augmentait, plus l'indice de rigidité aortique augmentait [54].

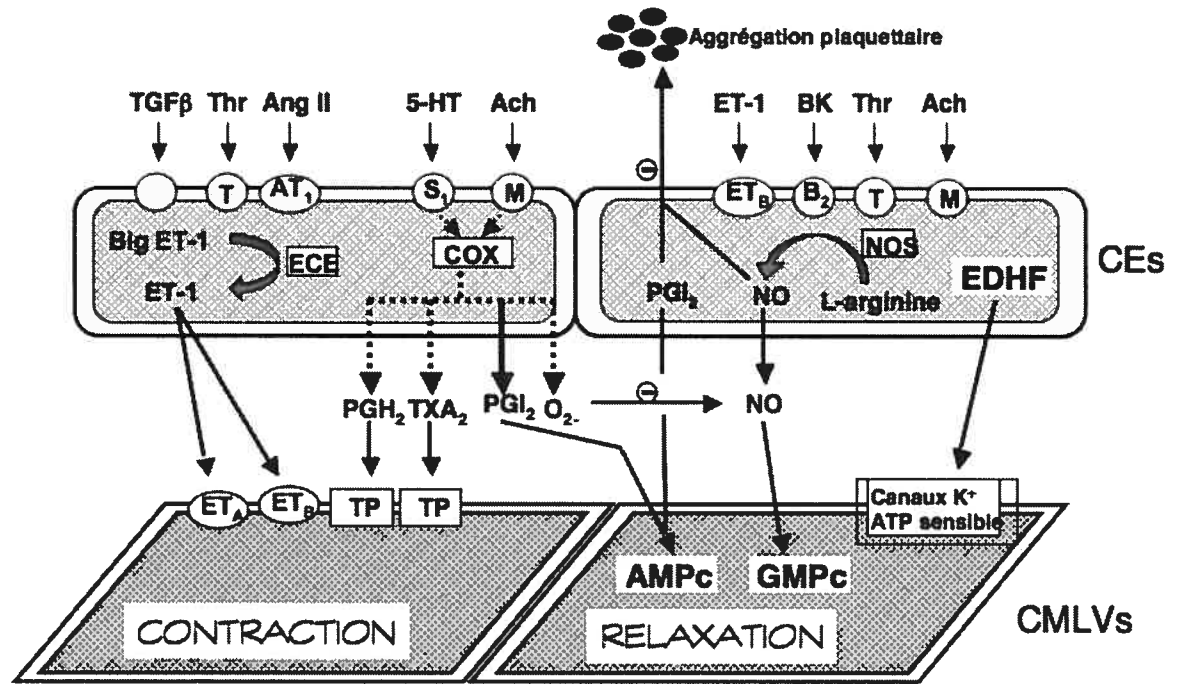


Figure 7. Facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium.

Les cellules endothéliales synthétisent différentes molécules vasodilatrices ou vasoconstrictrices suite à divers stimuli. Adapté de Cosentino et al. 2001, Curr Hypertens Rep [55].

Abbreviations

CEs, cellules endothéliales; CMLVs, cellules du muscle lisse vasculaire; ET-1, endothéline-1; ECE, enzyme de conversion de l'ET; ET_A et ET_B, récepteur de type A et B de l'ET; PGH₂, prostaglandine H₂; TXA₂, thromboxane A₂; TP, récepteurs aux thromboxanes; PGI₂, prostacycline; O₂⁻, stress oxydatif; NO, monoxyde d'azote; NOS, synthétase du NO; EDHF, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; TGF, facteur de croissance tumoral; T, récepteur pour la thrombine (Thr); AT₁, récepteur AT₁ de l'angiotensine II (Ang II); S₁, récepteur de la sérotonine (5-HT); M, récepteurs des minéralocorticoïdes; Ach, acétylcholine; B₂, récepteur de la bradykinine (BK).

i. L'endothéline

Entre 1982 et 1987, plusieurs équipes [56, 57] montrèrent l'existence d'un facteur présent dans l'endothélium et possédant une puissante activité vasoconstrictrice. En 1988, Yanagisawa et coll. [49] isolait un peptide vasoconstricteur à partir de cellules endothéliales vasculaires porcines aortiques. Les progrès de la biologie moléculaire ont alors permis en un an d'isoler, de déterminer chimiquement et de cloner le gène du plus puissant vasoconstricteur connu chez les mammifères : l'ET.

Isoformes

L'ET est un peptide monomérique de 21 acides aminés comprenant deux ponts disulfures. Ce peptide existe sous trois isoformes : ET-1, ET-2 et ET-3. Leur expression est sous le contrôle de trois gènes situés sur des loci chromosomiques différents. Ils comportent tous, au niveau de leurs parties communes, les régions importantes pour leur activité biologique [58]. C'est entre les résidus 4 et 7 que les séquences en acides aminés varient entre les trois isopeptides. Donc, cette région variable déterminerait les caractéristiques fonctionnelles propres à chacun des isoformes.

Biosynthèse

Comme plusieurs hormones, l'ET est synthétisée sous forme de précurseur, la prépro-ET, constituée de 212 acides aminés. L'ARNm de la prépro-ET-1 est exprimé de façon constitutive dans les cellules endothéliales et il est très instable avec une demie-vie

d'environ 15 minutes [59]. Rapidement après sa traduction, la prépro-ET subit l'action d'une endopeptidase menant à la formation de la big-ET (38 acides aminés) qui possède d'ailleurs de faibles propriétés vasoconstrictrices [60]. À son tour, la big-ET est clivée par l'enzyme de conversion de l'ET (ECE) afin de donner le peptide mature et physiologiquement actif qu'est l'ET. Chacune des isoformes possède sa propre ECE. La synthèse et la sécrétion de l'ET se produisent au niveau des cellules de l'endothélium vasculaire, mais aussi au niveau des cellules épithéliales [61], du système nerveux central, du placenta, des cellules mésangiales et glomérulaires, de l'épithélium du tube collecteur et des vasa recta médullaires [62].

Récepteurs

Des récepteurs spécifiques de l'ET ont été séquencés par clonage de l'ADN complémentaire (ADNc). Ces récepteurs à 7 domaines transmembranaires sont couplés aux protéines G. Le récepteur ET_A contient 427 acides aminés et lie avec une plus grande affinité l'isoforme ET-1 que ET-2 et ET-2 que ET-3 (ET-1 > ET-2 > ET-3) [63]. Cependant, le récepteur ET_B lie les trois isoformes avec la même affinité [64]. Des études pharmacologiques indiquent qu'il existerait des sous-classes du récepteur ET_B, mais ce n'est pas encore bien défini. Récemment, un troisième type de récepteur à l'ET, le récepteur ET_C, a été isolé et cloné à partir de cultures de *xenopus leavis* [65] et il semble avoir une grande affinité pour l'ET-3 par rapport à l'ET-1 et l'ET-2. Par contre, l'existence de ce récepteur chez les mammifères reste inconnue à ce jour [66]. L'ET-1 peut lier avec une haute affinité via sa partie N-terminale et C-terminale le récepteur ET_A, mais le

récepteur ET_B lie seulement sa portion C-terminale. Ceci suggère que la reconnaissance moléculaire du récepteur pour son ligand se fait via la partie N-terminale où se trouve d'ailleurs les différences structurales et séquentielles entre les trois isoformes [16].

Effets vasculaires

Au niveau vasculaire, les effets de l'ET sur les CMLVs dépendent de la localisation de ses récepteurs. En effet, la liaison de l'ET sur ses récepteurs ET_A et ET_B situés sur les CMLVs mène à une vasoconstriction, une prolifération et une croissance de ces dernières. Par contre, lorsque l'ET lie ses récepteurs ET_B localisés sur les cellules endothéliales, on observe une vasodilatation et une inhibition de la croissance des CMLVs via la synthèse de NO et de prostacycline [67] (voir Figure 8). De plus, l'ET favorise la synthèse de collagène engendrant de la fibrose vasculaire [68]. L'ET est donc également impliqué dans la pathogenèse de la cicatrisation tissulaire [69].

Voix de signalisation activées

Suite à la liaison de l'ET sur ses récepteurs, l'ET peut activer plusieurs voies de signalisation intracellulaires menant à une action physiologique. Diverses études ont montré que l'ET pouvait activer la voie de la phospholipase C (PLC) causant l'hydrolyse rapide du phosphatidyl inositol pour former le 1,4,5-inositol triphosphate (IP₃) et une accumulation soutenue de 1,2-diacylglycérol (DAG). L'IP₃ est une molécule importante de signalisation intracellulaire. Il stimule la relâche de calcium (Ca²⁺) du réticulum sarcoplasmique. Plusieurs études *in vitro* ont démontré que l'ET-1 induisait tout d'abord

une augmentation rapide et transitoire de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), puis une élévation soutenue du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les CMLVs [70]. L'augmentation initiale transitoire du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ne serait pas dépendante du Ca^{2+} extracellulaire, mais plutôt le résultat de l'induction par l' IP_3 de la mobilisation du Ca^{2+} provenant du réticulum sarcoplasmique. Toutefois, l'augmentation soutenue du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est due à un influx du Ca^{2+} extracellulaire via les canaux calciques voltage dépendant de type L et dihydropyridine sensibles et des canaux calciques récepteur dépendant [71] (voir Figure 8). L'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induit la contraction des CMLVs via l'interaction actine-myosine. L'ET induit aussi l'activation de la phospholipase A_2 [72] et D [73] et le métabolisme de l'acide arachidonique. L'activation de la phospholipase D contribue à l'accumulation soutenue du DAG ce qui pourrait mener à l'activation prolongée de la protéine kinase C (PKC) [74] capable de moduler l'intensité de la vasoconstriction. Comme mentionné plus haut, en plus d'être un agent vasoconstricteur, l'ET est aussi reconnu pour être mitogénique et induisant la synthèse de collagène. L'ET induit la phosphorylation des résidus sérine et thréonine des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), ainsi que l'expression de différents proto-oncogènes comme *c-fos*, *c-myc* et *c-jun* [75, 76] (voir Figure 8). Donc, l'ET contribue au remodelage cardiovasculaire hypertrophique et/ou hyperplasique associé à plusieurs états physiopathologiques. L'ET peut aussi induire ses effets par l'activation de la NO synthétase endothéliale [20]. Sous l'effet de l'ET, une cellule peut donc activer diverses voies de signalisation, par contre, la manière avec laquelle la cellule peut intégrer toutes ces informations reste encore mal définie.

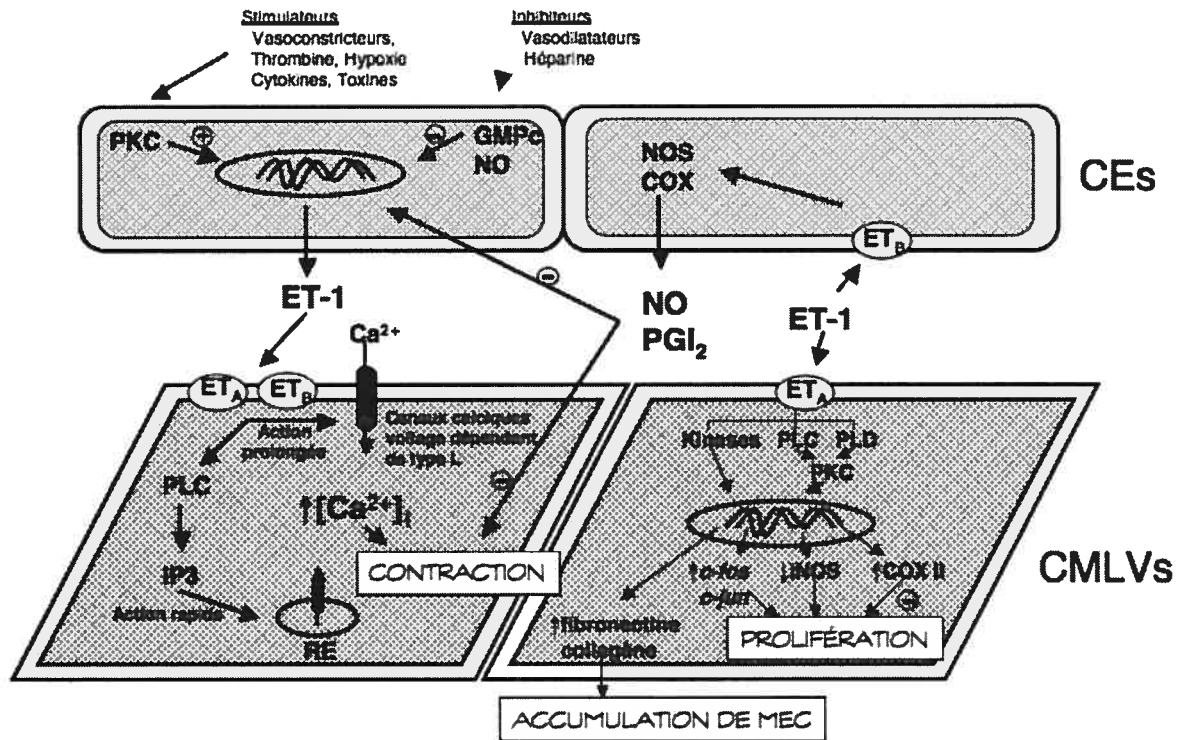


Figure 8. Effets vasculaires de l'endothéline.

L'ET-1 synthétisé par les CEs peuvent, en se liant à ses récepteurs situés sur les CMLVs, activer différentes voies de signalisation menant soit à la contraction ou à la prolifération des CMLVs ou encore à l'accumulation de MEC dans la paroi vasculaire. Adapté de Nord EP. 1997, Blood Purif [77].

Abbreviations

PKC, protéine kinase C; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; NO, monoxyde d'azote; NOS, NO synthétase; COX, cyclooxygénase; CEs, cellules endothéliales; ET-1, endothéline-1; PGI₂, prostacycline; ET_A et ET_B, récepteurs de type A et B de l'ET; PLC et PLD, phospholipase C et D; IP₃, inositol triphosphate; RE, réticulum endoplasmique; CMLVs, cellules du muscle lisse vasculaires; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, concentration de calcium intracellulaire.

Antagonistes des récepteurs de l'endothéline

Pour inhiber les effets de l'ET, plusieurs antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B de l'ET ont été synthétisés. Certains sont spécifiques pour un seul type de récepteur, tandis que d'autres sont non spécifiques et antagonisent les deux. À ce jour, seul le bosentan, un antagoniste non spécifique, a été approuvé pour traiter l'hypertension pulmonaire primaire chez l'humain[78].

b. Tunique médiale

La tunique médiale est majoritairement responsable des propriétés élastiques des grosses artères. Les « *cross-links* » ou ponts moléculaires entre les composantes de la matrice extracellulaire (MEC), tels que l'élastine et le collagène, et les interactions cellules-matrice confèrent les propriétés mécaniques adéquates nécessaires au rôle de ces artères. Les CMLVs représentent de 30 à 50% du volume de la média et sont probablement la composante la moins rigide de la paroi vasculaire. Les lamelles élastiques formées d'élastine sont très extensibles et représentent 25% du volume. Ce sont ces lamelles qui déterminent en grande majorité l'élasticité du vaisseau à des valeurs de pression physiologiquement normales. Les fibres de collagène, qui représentent 35% du volume, sont beaucoup plus rigides que les CMLVs et les lamelles élastiques, ce qui permet de maintenir l'intégrité de l'artère quand cette dernière est significativement étirée. Ainsi, l'élasticité des grosses artères diminue avec une augmentation de pression, car les composantes plus rigides de la paroi sont séquentiellement recrutées [43].

i. Méthodes utilisées pour mesurer la rigidité artérielle

Plusieurs méthodes sont utilisées afin d'obtenir un indice de rigidité artérielle. Le Dr. O'Rourke les résume très bien dans le tableau 2 [42]. Expérimentalement, dans des conditions *in vivo*, la vitesse de l'onde de pouls ou *pulse wave velocity* (PWV) est l'indice à mesurer pour définir la rigidité aortique. Cet indice est perçu comme un intégrateur du « dommage » artériel associé au vieillissement et aux pathologies chroniques (hypertension, diabète, insuffisance rénale) [79].

Tableau 2. Indices de rigidité artérielle

Indice	Définition	Formule mathématique
Module élastique*	Le saut de pression requis pour que le vaisseau soit étiré à 100% (en théorie) à partir du diamètre de repos à une longueur de vaisseau fixe.	$(\Delta P \cdot D) / \Delta D$ (mmHg)
Distensibilité artérielle*	Le changement relatif du diamètre (ou aire) pour une certaine augmentation de pression; c'est l'inverse du module élastique.	$\Delta D / (\Delta P \cdot D)$ (mmHg ⁻¹)
Compliance artérielle*	Le changement absolu du diamètre (ou aire) pour un saut de pression donné à une longueur de vaisseau fixe.	$\Delta D / \Delta P$ (cm/mmHg ou cm ² /mmHg)
Module du volume élastique*	Le saut de pression requis pour une augmentation (théorique) de 100% de volume.	$\Delta P (\Delta V / V)$ (mmHg)
Module de Young*	Le saut de pression par cm ² requis pour un étirement (théorique) de 100% de la longueur de repos.	$(\Delta P \cdot D) / (\Delta D \cdot h)$ (mmHg/cm)
Impédance*	La relation entre le changement de pression et le débit sanguin en absence d'ondes de réflexion.	$\Delta P / \Delta v$ [(mmHg/cm)/s]
Indice de rigidité β	Rapport entre le logarithme (PAS/PAD) et le changement relatif de diamètre.	$\beta = [\ln (PAS/PAD)] / [(Ds - Dd) / Dd]$
Vitesse de l'onde de pouls*	La vitesse de déplacement de l'onde de pouls à travers un segment artériel.	Distance/ Δt (cm/s)

Abbréviations: P, pression; D, diamètre; V, volume; t, temps; v, débit sanguin; s, systolique; d, diastolique. *Ces indices sont site spécifique et varie selon la « *distending pressure* ».

1.2.2. Altération des artères de conductance dans le vieillissement

Au cours du vieillissement normal, une multitude de changements s'effectuent dans la paroi vasculaire des artères de conductance. Plusieurs de ces altérations contribuent à l'augmentation de la rigidité de ces vaisseaux. Le tableau 3 résume les différentes altérations, associées à l'âge, observées au niveau de l'aorte [80, 81].

Tableau 3. Changements vasculaires associés au vieillissement.

Altérations aortiques
↑ du diamètre
↑ de la rigidité de la paroi
↑ de l'épaisseur de la paroi
<i>Intima</i>
↑ de l'épaisseur : CMLV et matrice extracellulaire
↑ du TGF- β , mais ↓ des effets antiprolifératifs
↑ des niveaux et activité de MMP 2
↑ de l'expression des molécules d'adhésion
↑ de l'activité de l'ECA
<i>Média</i>
↑ de l'épaisseur
CMLV : ↑ de leur grosseur, mais ↓ de leur nombre
<i>Matrice extracellulaire</i>
↑ du contenu en collagène
↑ ponts intermoléculaires entre les molécules de collagène
↑ de la fibronectine
↓ de l'élastine : calcification et fragmentation
↑ des glycosaminoglycans
<i>Dysfonction endothéliale</i>
↓ du NO, ↑ du superoxyde, ↑ du péroxynitrite
↑ de l'expression des molécules d'adhésion
↑ de la perméabilité
↑ de l'ET

Abbréviations: CMLV, cellules du muscle lisse vasculaire; TGF- β , « *transforming growth factor beta* »; MMP-2, métalloprotéinase matricielle de type 2; ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine II; NO, monoxyde d'azote; ET, endothéline.

a. Dysfonction endothéliale

Plusieurs études cliniques ont montré que la vasodilatation dépendante de l'endothélium déclinait progressivement avec l'âge [82] autant dans les artères de conductance [83-85] que dans les artères de résistance [86, 87]. Des évidences indiquent que le vieillissement mène à une atténuation de la formation et de la relâche ou à une dégradation plus rapide de facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium, tels que le NO, la prostacycline et l'EDHF. Ces observations chez l'humain ont été supportées par une multitude d'études chez l'animal. Il faut toutefois noter que la vasorelaxation indépendante de l'endothélium induite par le sodium nitroprusside (SNP) n'est pas affectée par le vieillissement.

Plusieurs études qui avaient pour but d'élucider les mécanismes menant à la dysfonction endothéliale ont été conduites chez l'animal et en particulier chez le rat. Dans l'aorte de rat, la relaxation endothélium-dépendante est *a priori* un indicateur de la bio-disponibilité du NO qui est déterminée par son taux de production, mais aussi par sa neutralisation par l'anion superoxyde [88]. Certains auteurs ont démontré que l'expression de la eNOS diminuait avec l'âge [89-91]. Le mécanisme menant à cette diminution de eNOS reste encore inconnu. Par contre, on sait que certains facteurs ou stimuli comme les oestrogènes, les facteurs de croissance et le peroxyde d'hydrogène induisent l'expression de la eNOS et ces derniers diminuent avec l'âge [82].

Comme la plupart des autres types cellulaires, la capacité des cellules endothéliales à se diviser est limitée. Ultimement, les cellules entrent dans un état irréversible d'arrêt de croissance, ce qu'on appelle la sénescence. Les cellules sénescents sont métaboliquement actives, mais morphologiquement altérées et elles expriment la β -galactosidase acide, une enzyme caractéristique de la sénescence. La longueur des télomères est un autre indice de la sénescence. Les télomères sont essentiels pour l'intégrité des chromosomes, et durant chaque duplication de l'ADN, approximativement 50 à 200 paires de bases de l'ADN télomérique ne se répliquent pas. La sénescence est atteinte lorsque les télomères sont plus courts qu'une certaine longueur critique qui dépend du type cellulaire, par exemple, l'entrée en sénescence des fibroblastes humains s'effectue alors que la taille moyenne de l'ADN télomérique est de 2000 à 3000 nucléotides [92]. La longueur des télomères est donc inversement proportionnelle à l'âge. La sénescence pourrait ainsi être une autre explication possible à la dysfonction endothéliale lors du vieillissement.

Une des conséquences de l'affaiblissement de la fonction endothéliale vasodilatatrice associée à l'âge est l'augmentation de la réactivité vasculaire aux facteurs vasoconstricteurs et en particulier à l'ET. En effet, Barton et al ont montré que la relaxation endothélium-dépendante de l'acétylcholine était diminuée dans l'aorte chez les rats âgés (32 à 33 mois) et que les taux plasmatiques d'ET et de ECE chez ces rats étaient augmentés [90]. Ainsi ce déséquilibre entre les facteurs relaxants et constricteurs semble contribuer en partie à l'augmentation de la rigidité des gros troncs dans le vieillissement en augmentant le tonus des CMLVs.

b. Détérioration de la composition de la tunique médiale

i. Les CMLVs

Plusieurs études ont montré que le nombre de CMLVs dans la paroi vasculaire déclinait au cours du vieillissement [93, 94]. Ceci peut être expliqué par une réduction généralisée de l'activité cellulaire qui ne peut alors compenser l'apoptose dans la paroi vasculaire [93]. Du matériel fibreux prendrait alors la place des CMLVs mortes. Les CMLVs restantes, qui deviennent progressivement plus volumineuses (hypertrophie), seraient alors entourées de plus de collagène réduisant ainsi le contact entre les cellules [93, 94]. La contribution des CMLVs à la rigidité des gros troncs semble être proportionnelle à leur tonus. Comme mentionné plus haut, la dysfonction endothéliale qui apparaît progressivement avec le vieillissement, augmente le tonus vasculaire suite à un déséquilibre entre les agents vasorelaxants et vasoconstricteurs. Par contre, la désactivation des CMLV ne permet pas d'abolir la rigidité vasculaire induite par l'âge [95]. De plus, les artères musculaires où le tonus vasculaire est aussi augmenté au cours du vieillissement ne se rigidifient pas avec l'âge contrairement aux artères de conductance, suggérant que les composantes structurales de la MEC contribuent majoritairement à la rigidité des grosses artères [95].

ii. Le collagène

Parmi les 26 types de collagène décrits jusqu'à maintenant, les collagènes de type I et III sont ceux détectés en grande partie dans la paroi vasculaire, représentant 60% et 30%

respectivement du collagène vasculaire [44]. Il a été observé que la concentration des fibrilles de collagène augmentait après 50 ans [96]. Les fibrilles de collagène nouvellement synthétisées sont solubles en solution saline et n'ont pas de force structurale. Lors de la formation de ponts intermoléculaires, les fibrilles de collagène deviennent insolubles, plus réfractaires à l'action enzymatique des collagénases favorisant son accumulation dans la paroi vasculaire et enfin, montrent une augmentation graduelle de leur force structurale. Les ponts intermoléculaires contribuent à l'augmentation de la rigidité artérielle et quelques études suggèrent que ce processus est augmenté avec l'âge [43]. La formation des ponts implique deux mécanismes distincts : un initié par l'enzyme lysyl oxydase (LOX) et l'autre par la réaction non-enzymatique de Maillard [97]. La LOX catalyse l'oxydation d'un résidu lysine ou hydroxylysine spécifique; l'aldéhyde résultant subit alors une série de réactions avec des résidus adjacents pour former des ponts autant intermoléculaires qu'intramoléculaires [98]. La formation non-enzymatique des ponts fut décrite par Maillard en 1912 [99]. Il a alors observé la formation d'un pigment jaune-brun qui résultait d'une réaction de glycosylation non enzymatique entre le glucose et les protéines. La formation précoce de produits de glycosylation que sont les bases de Schiff est relativement rapide et hautement réversible [100]. Après quelques jours, la base de Schiff se réarrange pour former un composé plus stable, le produit d'Amadori, un autre produit de glycosylation précoce. Le produit d'Amadori subit alors une série de réactions (pas toutes encore comprises) pour former les AGEs (« *advanced glycosylation end-products* » ou produits avancés de glycation) [100, 101]. Les AGEs peuvent alors réagir avec les groupes d'acides

aminés libres d'une protéine adjacente pour former des ponts intermoléculaires diminuant ainsi la compliance des gros troncs (voir Figure 9). Les AGEs peuvent aussi lier leurs récepteurs, les RAGEs, pour promouvoir la libération de cytokines des CMLVs et l'inhibition de l'adhésion cellulaire, qui peuvent augmenter l'apoptose [102]. L'accumulation des AGEs se fait tout au long du vieillissement et est accélérée par le diabète. Il existe une corrélation entre l'accumulation des AGEs sur le collagène et la rigidité des artères de conductance induite par le vieillissement [103]. Comme le collagène est une protéine avec un très faible renouvellement (longue demi-vie), il est alors très probable qu'au cours du vieillissement il y ait une forte accumulation de AGEs sur le collagène. L'utilisation des inhibiteurs de la formation des ponts moléculaires par les AGEs tels l'aminoguanidine et la pyrodoxamine, prévient l'augmentation de la rigidité des grosses artères [79, 104]. De même, les molécules capable de briser les ponts formés par les AGEs, comme l'ALT-711, peuvent améliorer la compliance des grosses artères chez le rat âgé [105].

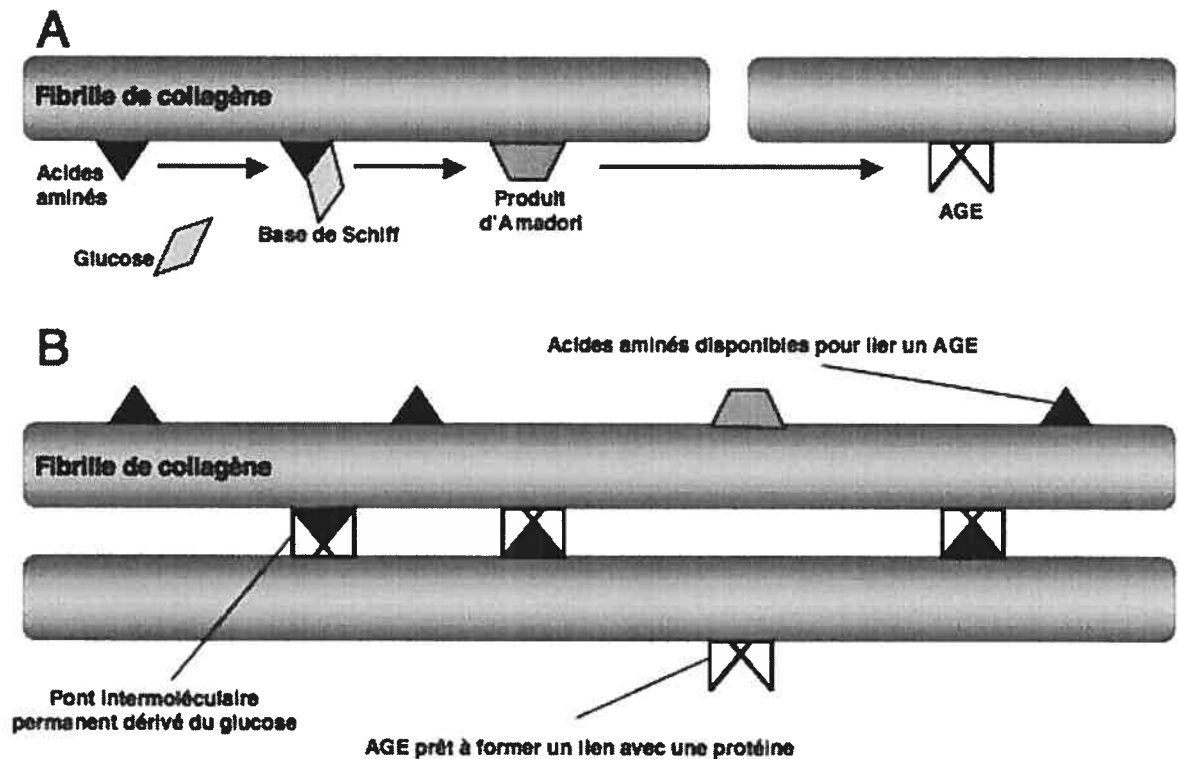


Figure 9. Description schématique de la formation des produits avancés de la glycation et des ponts intermoléculaires entre les fibrilles de collagène.

(A) Le glucose peut se lier à un groupe aminé (NH_2) d'une protéine comme le collagène pour former une base de Schiff qui deviendra un produit d'Amadori. Ce produit, suite à diverses réactions pas encore toutes connues, se transforme en un AGE. (B) Les AGEs peuvent réagir avec des groupes aminés libres d'une protéine adjacente pour former un pont intermoléculaire. Adapté de Aronson D. 2003, Journal of Hypertension [106].

Abbréviations

AGE (*advanced glycation end-products*), produits avancés de la glycation.

iii. Les lamelles élastiques

L'élastine est la protéine la plus abondante dans la paroi vasculaire et représente 90% du contenu des lamelles élastiques, qui sont également composées de glycoprotéines comme la fibrilline-1 et de ponts de MAGP (*microfibril-associated glycoprotein*) [44]. Les lamelles élastiques sont formées à partir de monomères de tropoélastine solubles et de microfibrilles composées de fibrilline-1 qui s'assemblent et se lient (par des ponts de desmosine et d'isodesmosine formés sous l'action de la LOX) au niveau de plusieurs résidus [107]. L'élastine est principalement synthétisée au début du développement suivi d'un très lent renouvellement (demi-vie d'environ 40 ans) [94]. En effet, l'élastine est une des protéines les plus stables du corps humain, ce qui a pour conséquence d'être une protéine très vulnérable aux altérations lors du vieillissement [44].

Malgré tout ce qui a été mentionné précédemment, il est important de noter que l'augmentation de la rigidité des artères de conductance observée lors du vieillissement est un processus dégénératif principalement provoqué par la fracture des lamelles élastiques médiales [108]. Cette fracture trouve son origine dans la fatigue de ce biomatériau suite au cumul des chocs pariétaux des ondes de pression intraluminale générées par chaque battement cardiaque. D'autres facteurs sont aussi impliqués tels qu'un changement de l'équilibre entre la synthèse de l'élastine et l'élastolyse et l'accumulation âge-dépendante de calcium sur les lamelles élastiques, processus aussi appelé élastocalcinose [108].

Les forces mécaniques qui déforment la paroi artérielle peuvent induire des changements de structures et de fonction par l'intermédiaire des structures membranaires telles que les canaux ioniques sensibles à l'étirement [109] ou les intégrines sensibles aux forces de cisaillement [110]. Les trois facteurs physiques principaux qui contrôlent le remodelage pariétal sont la pression, le diamètre et le débit. Tous les trois sont candidats au contrôle du remodelage des lamelles élastiques avec l'âge, mais peu de détails sont encore connus sur les mécanismes impliqués [108]. Plusieurs observations suggèrent que le stress oxydatif et l'activation des cytokines sont augmentés avec l'âge. Ainsi la réponse inflammatoire non spécifique et les niveaux plasmatiques de TNF- α (« *tumor necrosis factor- α* ») et d'interleukine-6 (IL-6) sont augmentés avec l'âge [111, 112]. De plus, la production de TNF- α et d'IL-6 par la paroi aortique suite à un stress oxydatif induit par les liposaccharides augmente aussi avec l'âge [113]. Il est également possible que les AGEs provoquent la libération de cytokines via leurs récepteurs comme mentionné plus haut. Cependant les liens directs entre l'élévation du stress oxydatif et l'accumulation des AGEs avec l'âge, et l'activation du système des cytokines restent à être démontrés. Les cytokines peuvent altérer le contenu pariétal en élastine par l'activation des élastases ou l'inactivation de la synthèse d'élastine. D'ailleurs, la synthèse d'élastine par les CMLVs diminue avec l'âge en raison d'une baisse de l'expression du gène de la tropoélastine [114] et d'une réduction de l'activité de la LOX responsable de la formation des ponts moléculaires [94]. De plus, les cytokines peuvent activer les métalloprotéinases matricielles (MMP), dont la

MMP 12 qui a comme substrat principal l'élastine [115]. D'autres MMPs, telles que les gélatinases, peuvent également cataboliser l'élastine [116].

Les expériences citées ci-dessus nous ont permis de décrire les mécanismes potentiels via lesquels la quantité ou la composition de l'élastine dans la média change avec l'âge. La diminution avec l'âge du contenu en élastine reste toutefois controversée [117-119]. Il est certain cependant que les lamelles élastiques changent d'aspect morphologique, fracturent et fragmentent [93, 94]. De plus, l'accumulation de calcium sur ces dernières est un autre phénomène âge-dépendant contribuant à l'augmentation de la rigidité des artères de compliance. L'élastocalcinose augmente progressivement avec l'âge, indépendamment de pathologies vasculaires comme l'athérosclérose [120]. Ce phénomène sera d'ailleurs discuté en profondeur dans les prochaines sections de cette introduction. La perte de l'intégrité structurale du réseau élastique des artères de conductance provoquerait un transfert de la contrainte pariétale au collagène dont le module élastique est nettement supérieur à celui de l'élastine [108].

c. Calcification artérielle médiale ou élastocalcinose

Tout d'abord, il est important de noter qu'il existe quatre types de calcification macrovasculaire : la calcification athérosclérotique/fibrotique (intimale), la calcification des valves cardiaques, la calciphylaxie vasculaire et finalement, celle dont il est question dans cette thèse, la calcification artérielle médiale ou élastocalcinose. Le tableau 4 résume

les différentes caractéristiques de ces types de calcification macrovasculaire ainsi que les états pathologiques associés.

Tableau 4. Calcification macrovasculaire : un point de vue histoanatomique.

Type de calcification	Caractéristiques	Pathologies associées
Athérosclérotique	Nécrose cellulaire Déposition de calcium avec lipoprotéines Macrophages, cellules T, dysfonction endothéliale, plaquette et activation des myofibroblastes Métaplasie du cartilage, cartilage calcifié, formation osseuse endochondrale	Athérosclérose Hypercholestérolémie
Calcification valvulaire	Activation des cellules interstitielles/inflammation Cellules T, macrophages, adipocytes interstitiaux et myofibroblastes Déposition de calcium dystrophique Ostéogénèse, formation osseuse intramembranaire (non endochondrale) Métaplasie du cartilage rare/cartilage calcifié	Sclérose aortique sénile Calcification des valves aortiques bicuspide et tricuspide Calcification de valves bioprostétiques
Calcification artérielle médiale (élastocalcinose)	Activation de l'adventice/inflammation CMLVs médiales Ostéogénèse mimant la formation osseuse intramembranaire (non endochondrale) Pas de formation de cartilage	Diabète de type 1 et 2 Insuffisance rénale en phase terminale « Vieillesse »
Calciphylaxie vasculaire	Déposition de calcium/phosphate Calcium/phosphate dans le sérum >60mg ² /dl ² Pas d'ostéogénèse Pas de chondrogénèse	Insuffisance rénale en phase terminale Insuffisance rénale aiguë avec blessure au muscle, lyse tumorale Hyperphosphatémie iatrogénique

Abbréviations : CMLVs, cellules du muscle lisse vasculaire; CVCs, « *calcifying vascular cells* ». Adapté de Vattikuti et al, 2004 [121].

La calcification artérielle médiale survient indépendamment de l'athérosclérose. Elle est âge-dépendante et peut être accélérée par le diabète et l'insuffisance rénale. Sa morphologie est caractérisée par un dépôt linéaire le long des lamelles élastiques dans la tunique médiale. À des stages plus avancés ou sévères, on peut observer un feuillet de calcium circonférentiel très dense au milieu de la média. En 1944, Blumenthal et al ont rapporté que seulement 4% des patients âgés entre 20 et 30 ans avaient une calcification significative de leur aorte thoracique, contre 98% des individus âgés de plus de 50 ans [120] (voir Figure 10). Il a alors été suggéré que le contenu en calcium dans l'aorte augmente de 30 à 40 fois au cours d'une vie [122]. Une autre étude chez l'humain a démontré que l'accumulation de calcium dans l'aorte augmentait significativement avec l'âge dans la média et non pas dans l'intima, et ce de manière plus marquée au milieu de la média [123].

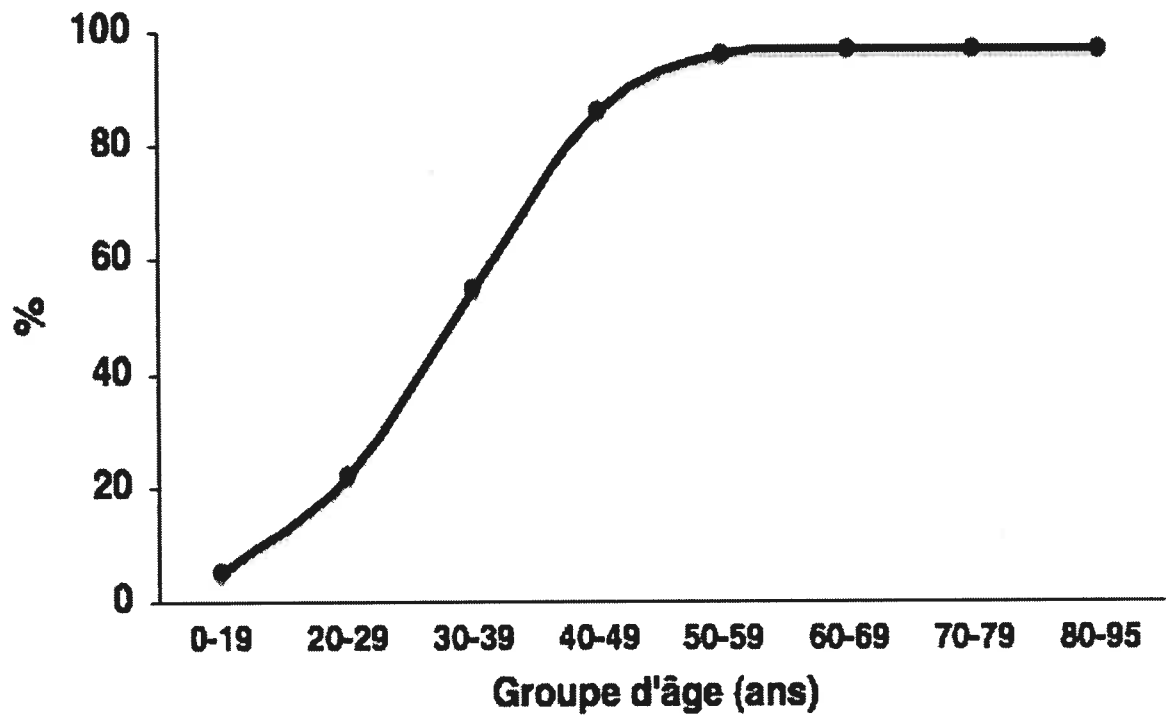


Figure 10. Incidence des patients atteints d'une calcification significative de leur aorte thoracique selon leur groupe d'âge.

Plus l'âge des patients augmente et plus l'incidence des gens avec une calcification significative de l'aorte thoracique augmente. En effet, après 50 ans pratiquement 90% des patients ont une calcification de leur aorte thoracique. Adapté de Blumenthal et al. 1994, Am J of Pathol [120].

Malgré son importance clinique, les mécanismes moléculaires de la calcification artérielle sont encore mal compris. La calcification vasculaire a longtemps été considérée comme un processus passif et non régulé en réponse à un dommage tissulaire (dégénération et fragmentation des lamelles élastiques) ou à une nécrose. La polarité de l'élastine augmente avec l'âge, lui conférant une plus grande affinité pour le calcium [124]. Cela suggérerait un simple dépôt de calcium causée par une attirance plus marquée par l'élastine. Cependant, plusieurs évidences ont permis d'établir que la calcification vasculaire (pathologique) est un phénomène actif et hautement régulé tout comme la biominéralisation des os (physiologique). En effet, plusieurs études ont montré que la minéralisation physiologique des os, des dents et du cartilage est régulée par divers mécanismes ordonnés et complexes [125]. De plus, certains travaux plus récents mettent en évidence que de nombreuses composantes de la régulation de la minéralisation physiologique sont aussi présentes dans celle pathologique (comme la calcification vasculaire) [125]. Ceci suggère que les mécanismes régulant la calcification vasculaire seraient similaires ou très proches à ceux contrôlant la biominéralisation des os. Donc, pour mieux comprendre ce qui se passe dans la calcification vasculaire, il est important de connaître les mécanismes de la biominéralisation osseuse afin d'y faire des parallèles.

i. Parallèles entre la biominéralisation osseuse et la calcification vasculaire

La minéralisation physiologique est caractérisée par une association entre une matrice extracellulaire (MEC) organique synthétisée, sécrétée et assemblée avec une phase

inorganique : l'hydroxyapatite qui contient du calcium, du phosphate et du carbonate. La structure et l'organisation du matériel de la MEC reflètent généralement l'activité cellulaire locale. Certaines cellules (ostéoblastes, chondroblastes...) sont directement responsables de l'initiation et de la production spécifique de MEC qui sera alors minéralisée (calcifiée). La MEC est plus que simplement réceptive à un dépôt de minéraux. Elle a une architecture et une composition moléculaire conçues pour permettre la nucléation et diriger la croissance des cristaux en tenant compte des demandes biomécaniques spécifiques d'un tissu donné (os, cartilage, dent). La MEC osseuse organique est composée de trois classes de protéines : i) les collagènes, ii) les « *noncollagenous proteins* » (NCP) et iii) les protéoglycans.

La MEC osseuse est principalement composée de collagène de type I (environ 90%). Le collagène de type I est une triple hélice formée de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. Plusieurs triple hélices s'assemblent pour former des fibrilles de collagène. Le collagène sert d'échafaudage pour la déposition d'hydroxyapatite. Il peut aussi lier et orienter d'autres protéines impliquées dans la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Au niveau vasculaire, il semblerait que le collagène de type I ait aussi un impact sur la calcification. En effet, dans les artères de patients avec une insuffisance rénale terminale, le degré de la calcification vasculaire était proportionnel à l'expression de certaines protéines matricielles dont le collagène de type I [126].

Les NCPs comprennent les glycoprotéines, les glycoprotéines avec un potentiel d'adhésion cellulaire et les protéines γ -carboxylées (gla). Les glycoprotéines comprennent

la phosphatase alcaline et l'ostéonectine, celles avec un potentiel d'adhésion cellulaire, l'ostéopontine, la fibronectine, la thrombospondine, la fibrilline et la *bone sialoprotein*. La *matrix Gla protein* et la *bone Gla protein* représentent majoritairement les protéines γ -carboxylées. Les NCPs représentent seulement 10% du volume de la MEC organique osseuse, toutefois, lors de la biominéralisation osseuse, si les NCPs sont absentes la minéralisation n'aura pas lieu malgré la présence de collagène. Ces protéines sont donc essentielles au processus de minéralisation physiologique. Ces protéines jouent également un rôle dans la calcification vasculaire [127] (voir section suivante).

Les protéoglycans (PG) sont des macromolécules contenant des chaînes de polysaccharides acides attachées à un corps central protéique. Durant la phase initiale de la biominéralisation osseuse, beaucoup de PGs (versican, glycosaminoglycan) sont produits et sembleraient délimiter la surface matricielle qui deviendra un os (minéralisée). La décorine, un autre PG, serait plutôt impliquée dans la régulation de la fibrillogénèse de collagène. Plusieurs études montrent que le rôle des PGs est similaire dans la calcification artérielle médiale [128]. Dans un modèle de calcification vasculaire (administration de vitamine D3) chez le rat, une grande quantité de PGs a été observée sur les lamelles élastiques dans la média artérielle (où a lieu la calcification) juste avant la calcification de ces dernières [129].

La biominéralisation osseuse s'effectue en plusieurs étapes. La première consiste à la relâche de vésicules dans la MEC par les ostéoblastes et les chondroblastes. Ces

vésicules semblent faciliter l'initiation de la déposition de minéraux en accumulant des ions calcium et phosphate dans un environnement protégé. De plus, elles contiennent des enzymes capables de dégrader des inhibiteurs de la minéralisation (ATP, pyrophosphate) qui se trouvent dans la MEC. Elles contiennent aussi un « *nucleational core* » composé de protéines et un complexe phospholipidique acide, du calcium et du phosphate inorganique, qui peut induire la formation d'apatite. Lorsque le cristal d'hydroxyapatite atteint une certaine grosseur, il brise la membrane de la vésicule et croît alors dans la MEC. Au niveau vasculaire, plusieurs stimuli (vitamine D, hormone parathyroïdienne, phosphore) induisent une transformation phénotypique des CMLVs en cellules semblables à des ostéoblastes. Ces cellules sont alors capables de faciliter la calcification de la MEC en exprimant des protéines associées à la formation osseuse (NCPs, PGs et collagène) et en formant des vésicules matricielles. Ce processus a d'ailleurs été montré dans des vaisseaux obtenus de patients diabétiques avec une calcification artérielle médiale [130]. La croissance des cristaux d'hydroxyapatite osseux est ensuite dirigée en partie par les contraintes du collagène dans la MEC (sur quoi les minéraux sont déposés). Les NCPs capables de lier les cristaux d'hydroxyapatite (ostéopontine, MGP, BGP, etc) peuvent aussi réguler leur grosseur et leur forme. Bref, les protéines de la MEC (normalement présentes dans les os) sont essentielles autant à la formation adéquate des os qu'à la calcification vasculaire. Par contre, les mécanisme exact régissant ce processus au niveau vasculaire reste encore à être défini, même si certaines fonctions de protéines matricielles commencent à être comprises (voir section suivante).

ii. Médiateurs moléculaires communs à la biominéralisation osseuse et à la calcification artérielle médiale

Matrix Gla protein

Le γ -carboxyglutamate (Gla) est un acide aminé peu commun qui lie le calcium. Il est important de noter que les résidus Gla lient avec une plus grande affinité l'hydroxyapatite que le calcium ionisé, suggérant que les Gla sont plus impliqués dans la liaison des précipités de calcium [131]. *In vitro*, les Gla préviennent la précipitation du calcium et inhibent la croissance des cristaux d'hydroxyapatite [132, 133]. La formation post-traductionnelle des résidus Gla est possible grâce à l'action de la γ -glutamate carboxylase, une enzyme vitamine K-dépendante qui agit sur certains résidus glutamate (Glu). Par exemple, si ce processus est inhibé par la warfarine qui prévient la formation des formes biologiquement actives de la vitamine K, les protéines contenant des Gla ne peuvent plus lier le calcium et avoir leur effet [134] (voir Figure 11).

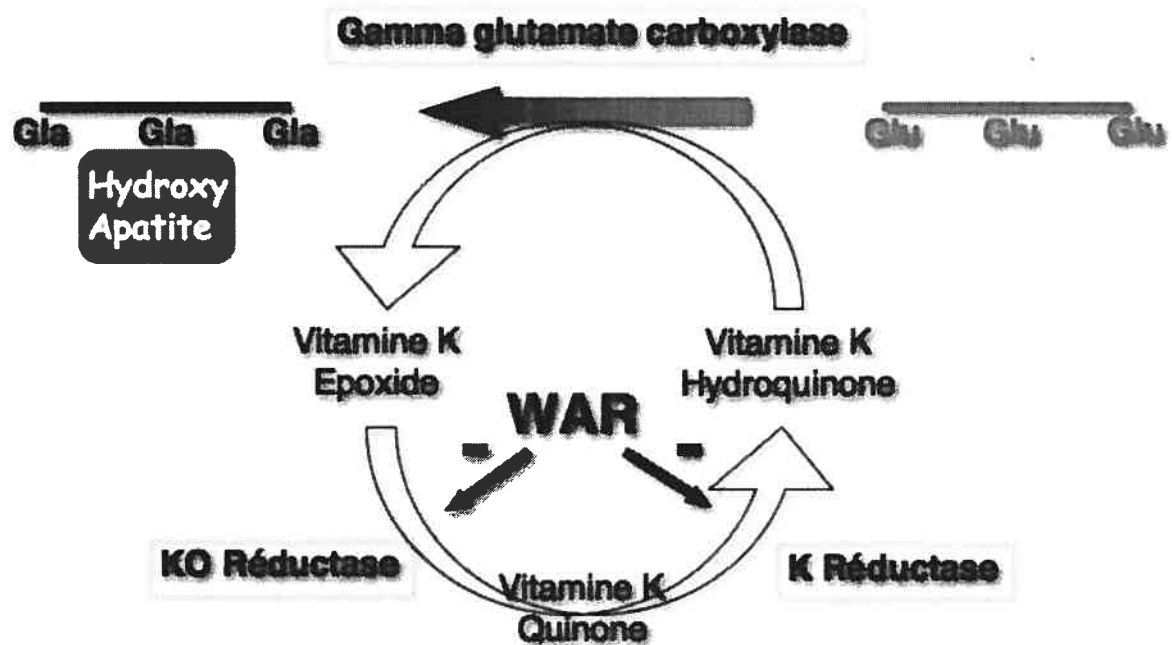


Figure 11. Représentation schématique de la gamma-carboxylation des protéines contenant des résidus Gla et de l'effet de la warfarine sur la voie enzymatique de la vitamine K.

Certaines protéines nouvellement synthétisées contiennent des glutamates qui pourront être gamma-carboxylés par la gamma-glutamyl carboxylase. Le carboxyglutamate permet de lier l'hydroxyapatite. La gamma-glutamyl carboxylase est toutefois dépendante de son co-facteur, la vitamine K hydroquinone, qui doit être recyclée après la gamma-carboxylation. La KO réductase et la K réductase permettent ce recyclage, la warfarine inhibe cependant l'action de ces deux enzymes. Adapté de Shanahan et al. 1998, Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression [134].

Abbreviations

WAR, warfarine; Glu, glutamate; Gla, carboxyglutamate.

La « *matrix Gla protein* » (MGP) est une protéine sécrétée de 10 kDa qui contient 5 résidus Gla. Elle a tout d'abord été identifiée au cours du développement osseux. L'expression de la MGP n'est toutefois pas confinée dans les tissus normalement calcifiés. Elle est aussi exprimée dans les tissus mous comme le rein, les poumons, le cœur et l'aorte [135]. Dans ces tissus mous, le rôle de la MGP, à cause de ses résidus Gla, serait de lier et d'envoyer les précipités de calcium dans la circulation [136]. De plus, la MGP peut inhiber les effets de la « *bone morphogenic protein 2* » (BMP-2) en la liant et ainsi empêcher la différenciation ostéoblastique induite par cette dernière. Cependant, le mécanisme d'action de la MGP n'est pas encore tout à fait connu. En outre, le rôle précis de la MGP dans la calcification des tissus mous est difficile à établir par des études purement observationnelles. Par contre, le phénotype des souris MGP $-/-$ a permis d'établir que la MGP est un inhibiteur essentiel de la calcification vasculaire [137]. De plus, deux syndromes humains pourraient résulter d'une anomalie de la MGP. Le syndrome Singleton-Merten est caractérisé par une calcification médiale de l'aorte, une petite stature, de l'ostéopénie, une diminution de la masse musculaire et la mort dans la première année de vie [138]. Le syndrome Keutel est quant à lui caractérisé par une calcification anormale du cartilage au niveau des oreilles, du nez, du larynx, de la trachée et des côtes, mais à ce jour aucune calcification artérielle n'a été reportée pour ce syndrome [139].

L'acide ribonucléique messager (ARNm) de la MGP est exprimé constitutivement par les CMLVs dans les vaisseaux sains. Malgré l'augmentation de la prévalence de l'élastocalcinose avec l'âge, il n'y a pas de preuve démontrant une diminution de

l'expression de l'ARNm de la MGP [134]. Étonnamment, une élévation de l'expression de l'ARNm de la MGP est observée dans les artères avec une sclérose de Mönckeberg (calcification médiale) chez l'homme [130]. La MGP essaierait alors de limiter la calcification induite par un stimulus indépendant de l'expression de son ARNm. Par contre, dans les artères de patients diabétiques, l'ARNm de la MGP est en plus petite quantité dans les artères calcifiées que non calcifiées. Ainsi, dans ce contexte précis, la diminution de l'expression de l'ARNm de la MGP serait un facteur causant l'initiation et le développement de la calcification artérielle médiale [134]. Il est toutefois important de noter que la MGP, pour être fonctionnelle, doit subir une γ -carboxylation, il donc est crucial de non seulement vérifier les taux d'ARNm et de protéines de MGP, mais aussi sous quelle forme elle est présente.

Comprendre comment est régulée la transcription de la MGP est essentiel afin de mieux saisir son rôle dans la calcification vasculaire. Le promoteur de la MGP humaine a été cloné et séquencé en 1990 par Cancela et al [140]. On y retrouve plusieurs séquences consensus comme les boîtes TATA et CAAT, des sites de liaison pour les facteurs de transcription AP1 et AP2, des éléments de réponse au métal et des sites de liaison qui pourraient être liés par des facteurs de transcription dépendant de l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc). Trois autres séquences potentiellement importantes ont été décrites. La première est très homologue à l'élément de réponse de l'acide rétinoïque. La deuxième partage des homologies de séquence avec le site de liaison au récepteur 1,25-dihydroxyvitamine D3. Finalement, la troisième est représentée par deux séquences

palindromiques partageant certaines homologies avec des séquences consensus pour les éléments de réponse aux hormones stéroïdiennes, ce qui permettrait une régulation de la MGP par l'œstrogène et les glucocorticoïdes [140].

Des études *in vitro* ont montré que l'acide rétinoïque augmentait l'expression de l'ARNm de la MGP dans certaines lignées cellulaires (fibroblastes humains, chondrocytes, ostéoblastes et pneumocytes de type II de rat) et la diminuait dans d'autres (cellules humaines de cancer du sein MCF-7 et des cellules rénales de rats NRK52E) [132, 141, 142]. Aucune étude n'a cependant évalué l'effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de l'ARNm de la MGP dans des CMLVs.

Les effets de la vitamine D3 sur l'expression de l'ARNm de la MGP varient aussi entre différentes lignées cellulaires. De plus, des études préliminaires sur l'effet de la vitamine D3 sur des CMLVs humaines et de rats ont montré que l'expression de l'ARNm de la MGP était augmentée dans les cellules de rats mais diminuée dans les cellules humaines [134]. De fortes doses de vitamine D3 élèvent les taux de calcium circulants et ultimement induisent une calcification vasculaire chez l'humain et dans des modèles expérimentaux animaux [143]. Il est possible que dans ce contexte, l'expression de la MGP soit augmentée par la vitamine D3 comme un mécanisme homéostatique initial afin de protéger les tissus mous de la calcification. Paradoxalement, chez les patients atteints d'insuffisance rénale, où les taux de vitamine D3 sont réduits, il y a une augmentation marquée de l'élastocalcinose [144]. Par contre, ces patients présentent souvent de

l'hyperparathyroïdie qui est associée à la calcification vasculaire. Bien que de forts niveaux d'hormone parathyroïdienne (PTH) puissent stimuler la transcription de la MGP via l'activation de voies dépendantes de l'AMPc, ceci est sûrement balancé par la réduction de la transcription vitamine D3-dépendante. Bref, la régulation de l'expression de la MGP dans des pathologies humaines est complexe, impliquant plusieurs molécules régulatrices.

Deux études ont démontré que la MGP était augmentée dans les cellules apoptotiques [145, 146]. Dans les études utilisant des cellules épithéliales de rat, l'apoptose était induite soit par l'addition de vitamine D3, soit par le retrait d'androgènes. Comme ces deux manœuvres peuvent réguler la transcription de la MGP indépendamment de l'apoptose, il n'est pas clair si les changements d'expression de la MGP sont induits par l'apoptose ou les traitements (ajout de vitamine D3 ou retrait d'androgènes). Cependant, il est tentant de spéculer que l'augmentation de l'expression de la MGP pourrait être requise dans les régions de mort cellulaire afin d'inhiber l'accumulation de calcium et la calcification subséquente des tissus. L'association courante entre la mort cellulaire et la calcification nous suggère qu'une certaine forme d'inhibition soit requise [134].

Les différentes observations montrant que l'expression de l'ARNm de la MGP est augmentée en association avec la calcification vasculaire *in vivo* impliquent qu'un mécanisme de transcription, qui reste encore à élucider, existe afin d'augmenter l'expression de la MGP en réponse à la calcification. Par contre, comme mentionné précédemment, la présence de l'ARNm de la MGP ne signifie pas nécessairement que la

protéine est fonctionnelle. Ceci est particulièrement pertinent pour les protéines contenant des résidus Gla, car elles doivent subir une modification post-traductionnelle de γ -carboxylation des résidus Glu pour obtenir des Gla. Malgré le fait que l'activité de γ -carboxylation ait été démontrée dans les vaisseaux sanguins, il y a des études qui suggèrent que les taux de vitamine K et de l'enzyme elle-même diminuent avec l'âge et en association avec la progression des maladies vasculaires [147, 148]. Par exemple, Jie et al. ont trouvé que la prise de vitamine K par des femmes post-ménopausées avec des valves aortiques calcifiées était moindre que celle de femmes du même type mais ayant les valves aortiques non calcifiées [149]. Il est alors possible que le vieillissement et d'autres facteurs environnementaux, comme la diète et la médication, mènent à la réduction de la fonction de la MGP. Il est intéressant de constater que la warfarine, qui inhibe la γ -carboxylation, est administrée de plus en plus dans la pratique médicale afin de contrer les risques de thromboembolie chez les patients souffrant d'arythmie et de maladies valvulaires. Cependant, les effets à long terme de la warfarine sur la calcification artérielle médiale chez l'humain n'ont pas encore été étudiés.

La phosphorylation est une autre modification post-traductionnelle qui peut affecter les propriétés de la MGP. La MGP peut être phosphorylée sur trois résidus sérine près de sa partie N-terminale [150]. Plusieurs autres protéines sécrétées contenant des groupes analogues de sérines phosphorylées, sont plus ou moins sécrétées dépendamment de leur degré de phosphorylation. Ainsi, certaines protéines sont très phosphorylées lorsqu'elles sont sécrétées dans le lait et la salive, mais le sont moins quand elles sont sécrétées dans la

MEC [151]. Il a donc été proposé que le degré de phosphorylation des résidus sérine pouvait réguler l'activité de certaines protéines sécrétées, incluant la MGP, mais aucune données n'a permis de corrélérer un changement de fonction de la MGP avec un changement d'état de phosphorylation [134].

Ostéopontine

L'ostéopontine (OPN) originalement appelé « *bone sialoprotein 1* » est une glycoprotéine acide hautement phosphorylable, localisée dans les tissus normalement calcifiés comme les os et les dents. Même si l'OPN n'est pas exprimée dans les artères saines, plusieurs études ont montré que l'OPN est abondamment présente aux sites de calcification dans les plaques athérosclérotiques, les valves aortiques calcifiées et dans la calcification artérielle médiale [152-154]. Ces résultats suggèrent que l'OPN pourrait être un important régulateur de la calcification vasculaire en condition pathologique. Même si la fonction précise de l'OPN n'est toujours pas définie, les régions conservées de l'OPN, c'est-à-dire les séquences RGD, les sites de phosphorylation sérine/thréonine et la séquence acide polyaspartate peuvent donner des indices sur ses diverses fonctions. L'association entre l'expression de l'OPN et la formation de cristaux de minéraux suggère un rôle pour l'OPN dans la régulation de la minéralisation physiologique et pathologique. Les liquides biologiques avec des concentrations élevés en sels de calcium (concentration suffisante pour induire la précipitation spontanée des sels de calcium), tels le lait, l'urine, la bile, et les fluides séminaux, sont souvent enrichis en OPN, suggérant que l'OPN permet de prévenir la précipitation spontanée des sels de calcium [155]. De plus, dans le rein, l'OPN

est surtout localisé dans la partie mince de l'anse de Henle qui est en aval d'une région très propice à la précipitation spontanée des sels de calcium [156, 157]. En accord avec ces observations, l'OPN, au niveau des os, inhibe la nucléation des cristaux et la croissance de l'hydroxyapatite. Cette inhibition semble être relié aux propriétés de liaison au calcium de l'OPN via ses séquences d'acide polyaspartate et ses sites de phosphorylation sur des résidus sérine. Il semble toutefois que ce sont les phosphates sur l'OPN qui inhibent majoritairement la formation et la croissance des cristaux tel que démontré par le groupe de Giachelli [158].

L'OPN peut subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation et la sulfatation. D'une part, l'OPN est phosphorylé sur certains résidus tyrosine, sérine et thréonine. Les caséines kinases I et II, les kinases du Golgi et les ectokinases peuvent toutes phosphoryler l'OPN. Giachelli et al. ont montré que la phosphorylation de l'OPN est requise pour l'inhibition de la calcification des CMLVs *in vitro* [158]. L'inhibition de cette calcification vasculaire *in vitro* est proportionnelle au nombre de sites phosphorylés sur l'OPN. De surcroît, si l'OPN est déphosphorylée par la phosphatase alcaline, elle n'a plus d'effet inhibiteur sur la calcification des CMLVs. D'autre part, une glycosylation significative de l'OPN, estimé à plus de 33% du poids de la protéine, survient dans la plupart des tissus [159]. La glycosylation de l'OPN synthétisée par des cellules transformées semble prévenir la phosphorylation de l'OPN [160]. Par contre, des études sur la formation osseuse *in vitro* ont montré que la sulfatation de l'OPN survient lorsque qu'elle est hautement phosphorylée, et cela a été suggéré comme étant un

marqueur pour les ostéoblastes différenciés [161]. Finalement, l'OPN est un substrat pour la transglutaminase tissulaire, indiquant que cette polymérisation de l'OPN survient dans les tissus conjonctifs [162]. Autant des ponts (*crosslink*) intramoléculaires, qu'intermoléculaires peuvent se former avec la fibronectine, et ces ponts ont été rapportés comme pouvant altérer la conformation de l'OPN et augmenter sa liaison au collagène [163].

Les interactions entre les séquences RGD de l'OPN et les intégrines $\alpha_v\beta_{1,3,5}$ [164, 165], $\alpha_9\beta_1$ [166] et $\alpha_8\beta_1$ [167] peuvent induire l'adhésion et la migration et cellulaire, la chimiotaxie et la signalisation intracellulaire de plusieurs types de cellules incluant les cellules endothéliales et rénales, les macrophages, les plaquettes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. La grande variété des signaux intracellulaires médiés par l'OPN s'explique par les multiples combinaisons hétérodimériques des chaînes d'intégrines qui peuvent lier l'OPN, ainsi que les différentes formes que peut avoir l'OPN [155]. Par exemple, l'OPN peut induire l'activité des ostéoclastes via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

L'expression de l'OPN est affectée par de nombreuses molécules telles que des cytokines, hormones et facteurs de croissance. Ces molécules peuvent influencer le taux de transcription génique, la stabilité et la traduction de l'ARNm ainsi que les modifications post-traductionnelles de l'OPN [168]. Même si en général la régulation de l'OPN est similaire dans différents tissus, il existe certaines différences notables d'un tissu à l'autre et parfois dans un tissu donné dépendamment des conditions physiologiques et

physiopathologiques [155]. En général, les stéroïdes, l'acide rétinoïque, les glucocorticostéroïdes, et particulièrement la vitamine D3 augmente l'expression de l'OPN dans les cellules osseuses [169, 170]. L'augmentation de l'OPN induite par les glucocorticoïdes est liée à la stimulation de la formation osseuse, alors que celle induite par la vitamine D3 est associée à la résorption osseuse massive, reflétant la multifonctionnalité de l'OPN dans le remodelage osseux [171]. L'expression de l'OPN est aussi régulée à la hausse par des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermal (EGF), celui dérivé des plaquettes (PDGF), le TGF- β , les BMPs et les cytokines inflammatoires [168]. Par contre, les biphosphonates (inhibiteurs de la résorption osseuse) réduisent l'expression de l'OPN dans les os et le rein. L'expression de l'OPN est aussi diminuée par les protéines kinases dépendantes du guanosinemonophosphate cyclique (GMPc), qui sont des médiateurs de la formation du NO, et par la signalisation du GMPc au niveau des CMLVs [172].

Ostéoprotégérine, *RANK* et *RANKL*

Depuis la découverte du « *receptor activator of nuclear factor κ B* » (RANK), de son ligand (RANKL) et de l'ostéoprotégérine (OPG), plusieurs questions ont été résolues sur leur développement, leur homéostasie et leur rôle pathologique dans les contrôles du recrutement, de la différenciation et de la fonction cellulaire. Par contre, certaines questions commencent seulement à être explorées dans le contexte de la biologie et physiopathologie vasculaire. Il est de plus en plus évident que ces molécules de la famille des TNF ont un rôle potentiel comme médiateur dans la biologie vasculaire.

Le RANKL est une protéine transmembranaire de 316 acides aminés hautement exprimée par les cellules T dans les tissus lymphoïques, par les ostéoblastes et les cellules stromales dans les os, et ce spécialement dans les zones qui présentent une activité de remodelage osseux ou d'inflammation ostéolytique [173, 174]. Le RANKL existe sous 2 formes solubles biologiquement actives, l'une sécrétée et l'autre clivée de la surface cellulaire. Il peut se lier sous forme d'homotrimère au RANK, un récepteur transmembranaire de 616 acides aminés (aussi un trimère), sur la surface des cellules de la lignée monocyte/macrophage, incluant les cellules dendritiques, les ostéoclastes et leurs précurseurs. Cette liaison va générer plusieurs signaux intracellulaires qui régulent la différenciation, la fonction et la survie cellulaire. L'action du RANKL est bloquée par l'OPG, un récepteur soluble de 380 acides aminés, fortement exprimé par les ostéoblastes, les cellules stromales et cardiovasculaires. Son rôle est donc de prévenir l'interaction entre le RANKL et son récepteur. L'OPG peut aussi lier et neutraliser l'activité de facteurs pro-apoptiques comme TRAIL (« *TNF-related apoptosis-inducing ligand* ») [175].

Dans les os, l'expression de RANKL par les ostéoblastes et les cellules stromales est essentielle pour le développement complet des ostéoclastes à partir des monocytes dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques. Les ostéoclastes ont pour rôle de déminéraliser les os (résorption osseuse). Ainsi la liaison RANK/RANKL favorise la résorption osseuse. Comme l'OPG contre directement toutes les actions induites par la liaison RANKL/RANK, l'OPG joue un rôle critique dans le remodelage osseux et la masse nette des os en diminuant la résorption osseuse [175]. Ainsi un débalancement entre le ratio

RANKL/OPG ou la signalisation de RANK pourrait être la cause de plusieurs pathologies squelettiques : perte osseuse (ostéoporose), formation osseuse excessive (ostéopétrose), désordre dans le remodelage osseux (ex : l'arthrite rhumatoïde, les maladie périodontales, et les tumeurs associées à l'ostéolyse). L'expression de RANKL dans les ostéoblastes et les cellules stromales est augmentée par différents signaux, comme la vitamine D3, la PTH, les glucocorticoïdes, la PGE2, l'IL-1 α , le TNF- α , l'IL-6, 11 et 17, le calcium et la cyclosporine A, mais est diminuée par le TGF- β . L'OPG est augmentée par certains de ces stimulus (vitamine D3, IL-1 α , TNF- α , IL-6, 11 et 17, calcium) et aussi par les estrogènes, le TGF- β et le BMP-2, mais diminuée par la PTH, les glucocorticoïdes, la PGE2 et les immunosupresseurs. *In vivo*, l'administration de RANKL chez la souris adulte normale hypertrophie les ostéoclastes et leur activité de résorption osseuse, induisant une hypercalcémie systémique [176]. Par contre, chez les souris RANKL -/- la formation et la fonction des ostéoclastes sont inhibées résultant en un phénotype sévère d'ostéopétrose [177]. Un phénotype similaire est observé chez les souris RANK -/- [178]. En plus de réguler la masse osseuse, RANKL et OPG sont essentiels pour la fonction des cellules dendritiques (leur survie et leur activité immunostimulatrice), l'organogénèse des nœuds lymphatiques et le développement des lymphocytes [177, 178].

L'OPG peut également être exprimé dans le cœur, les artères et les veines. Les cellules endothéliales et les CMLVs expriment de manière constitutive l'OPG. Par contre, le RANKL et le RANK ne sont presque pas détectables dans les artères et les valves aortiques non-calcifiées, mais leur expression a été rapportée dans les lésions aortiques

[176]. Le tableau 5 résume l'effet de différentes molécules sur l'expression de l'OPG, le RANK et le RANKL au niveau vasculaire.

Lors de la calcification artérielle médiale, l'OPG est habituellement exprimé autour des régions calcifiées où peu de RANKL est détecté [179]. Par contre, dans la calcification intimale (lors de l'athérosclérose) et valvulaire, il n'y a pas de changement de l'expression de l'OPG, mais RANKL est régulé à la hausse, suggérant que les taux élevés de RANKL peuvent d'une certaine façon favoriser ces types de calcification [180, 181]. Il a aussi été démontré que les niveaux d'OPG dans le sérum augmentaient souvent dans les différents types de calcification vasculaire. L'implication directe des taux circulants d'OPG dans la promotion de la calcification vasculaire n'est pas claire. Peut-être ces taux reflètent-ils une compensation visant à corriger le processus de minéralisation et ainsi exercer une protection vasculaire ou servent-ils d'indicateur de la pathologie vasculaire [175].

Tableau 5. Régulation de l'expression de l'OPG, du RANK et du RANKL au niveau des cellules endothéliales et des CMLVs.

Type cellulaire	Molécule	Stimulée par	Inhibée par	Pas d'effet par
Cellules endothéliales	OPG	IL-1, TNF- α , TGF- β		PTH, Vitamine D3, LPS
		OPN		
	RANKL	IL-1, TNF- α , TGF- β	?	PTH, Vitamine D3, LPS, TNF- α
CMLVs	RANK	VEGF	?	LPS, TNF- α
	OPG	PDGF, bFGF, Ang II, TNF- α , IL-1	Ligands du PPAR- γ , cyclosporine A	LPS, TNF- α
		?	?	LPS, TNF- α
	RANK	?	?	LPS, TNF- α

Abbreviations : OPG, ostéoprotégérine; IL-1, interleukine-1; TNF- α , facteur de nécrose tumorale de type α ; OPN, ostéopontine; TGF- β , facteur de croissance tumorale de type β ; PTH, hormone parathyroïdienne; LPS, liposaccharide; RANK, récepteur activateur du facteur nucléaire κB ; RANKL, ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire κB ; PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes; Ang II, angiotensine II; PPAR- γ , récepteur activé par les peroxisomes proliférateurs de type γ ; CMLVs, cellules du muscle lisse vasculaires.

Ostéonectine

L'ostéonectine est une protéine matricielle de 43 kDa aussi connue sous le nom SPARC (*secreted protein acidic and rich in cystein*). Elle est exprimée dans les régions de remodelage squelettique des os et autres tissus [182]. L'ostéonectine peut se lier au collagène et à l'hydroxyapatite et réguler la prolifération cellulaire et les interactions cellule-matrice [182]. *In vitro*, l'ostéonectine est un inhibiteur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite [183, 184]. Au niveau vasculaire, les CMLVs des artères saines expriment abondamment l'ostéonectine, mais dans la sclérose de Mönckerberg, l'expression de l'ostéonectine est réduite ou pratiquement absente [130]. Par contre, chez les souris déficientes en ostéonectine, aucune calcification vasculaire n'a été rapportée [185].

Core Binding Factor $\alpha 1$

Le facteur de transcription « *core binding factor $\alpha 1$* » (Cbfa-1) joue un rôle crucial dans la différenciation des ostéoblastes. Le Cbfa-1 lie l'élément de réponse 2, spécifique aux ostéoblastes, dans la région promotrice de la plupart des gènes exprimés par les ostéoblastes. D'ailleurs, chez la souris Cbfa-1 $-/-$, les ostéoblastes et les os ne se développent pas [186]. Au niveau vasculaire, Steitz et al. ont montré que dans un modèle de calcification vasculaire *in vitro*, les CMLVs changeaient de phénotype en exprimant moins d' α -actine, un marqueur spécifique des CMLVs, et en exprimant le Cbfa-1 normalement exprimé dans les os [187]. Ils ont confirmé ce résultat avec un modèle *in vivo*

d'élastocalcinose chez la souris, où les artères calcifiées exprimaient abondamment le Cbfa-1 [187]. Ce changement phénotypique des CMLVs vers un phénotype mimant celui des ostéoblastes semble suggérer une implication visant à favoriser la calcification des vaisseaux sanguins.

Bone morphogenic proteins

Les « *bone morphogenic proteins* » (BMPs) sont un groupe d'au moins 30 protéines reconnues pour leurs propriétés ostéoinductrices qui régulent la différenciation des chondroblastes et des ostéoblastes. Elles font partie de la superfamille des *tumor growth factors- β* (TGF- β). Les BMPs induisent leurs effets en se liant à leurs récepteurs I et II de type tyrosine kinase qui se trimérisent pour induire leur signal intracellulaire. Ainsi, les BMPs via leurs récepteurs peuvent induire la phosphorylation et la translocation au noyau des facteurs de transcription Smad menant à la transcription de gènes cibles comme l'ostéopontine, le collagène de type X et COX-2 [188]. Les Smads 6 et 7 sont par contre impliqués dans une boucle de rétroaction négative qui empêche la translocation au noyau du complexe Smad et ainsi arrêter la transcription des gènes cibles.

Les BMPs ont plusieurs effets au niveau vasculaire, la BMP-2 peut, *in vitro*, induire l'arrêt du cycle cellulaire des CMLVs empêchant leur prolifération. Si les CMLVs sont exposées plus longtemps à la BMP-2, elles changeront alors de phénotype en exprimant un profil génétique ostéoblastique, probablement dû à la stimulation des facteurs de transcription Msx2 et Cbfa-1. Il apparaît toutefois que la BMP-2 active majoritairement

Msx2 au niveau vasculaire [189]. Il a été identifié comme un régulateur critique de la formation intramembranaire des os. Ce facteur de transcription induit l'expression de gènes ostéogéniques comme la phosphatase alcaline et l'ostéopontine [190]. L'effet du Msx2 passe par la régulation à la hausse d'osterix (Osx), un régulateur transcriptionnel global de la minéralisation et de la différenciation des ostéoblastes [191]. L'Osx peut aussi être régulé par le Cbfa-1. Au niveau vasculaire, l'Osx agit en aval de Cbfa-1 et de Msx2 et son activation semble être en partie la cause du phénotype ostéoblastique qu'adopte les CMLVs et la minéralisation de la MEC (lamelle élastique) [189].

De plus, la BMP-2 peut augmenter l'apoptose des CMLVs. Certaines études ont montré que l'apoptose semble être une étape critique dans l'initiation et la propagation de la calcification des CVCs (« *calcifying vascular cells* ») [192]. De surcroît, chez les patients atteints de la sclérose de Mönckeberg (calcification médiale) ou d'athérosclérose (calcification intinale), des corps apoptotiques ont été identifiés aux endroits de calcification, et pourrait servir de sites de nucléation [179].

Le rôle de la BMP-2 sur la calcification peut aussi être modulé par la « *matrix Gla protein* » (MGP), un inhibiteur de la calcification vasculaire. Une étude a montré que des CMLVs dérivées d'aorte de souris déficientes en MGP, et non pas les CMLVs témoin, se différenciaient vers un phénotype chondrogénique et ostéoblastique lorsque stimulées avec la BMP-2 [193]. Comme la BMP-2 a seulement été trouvée dans les tissus calcifiés, il se peut que la calcification vasculaire survienne lorsqu'il n'y a pas d'opposition à la BMP-2,

et ce en partie à cause de la baisse d'expression d'inhibiteurs de la calcification comme la MGP.

Contrairement à la BMP-2 qui induit un phénotype ostéoblastique, la BMP-7 induit un phénotype vasculaire, c'est-à-dire l'expression de marqueurs spécifiques pour les CMLVs comme l' α -actine. Cet effet est dû à l'induction de p21 et la régulation à la hausse des Smads 6 et 7 qui ont un effet de rétroaction négative contrairement aux autres Smads. D'ailleurs, les souris *Smad6^{-/-}* développent une ossification de l'aorte autour de la crosse aortique [194]. Il y a aussi présence de métaplasie cartilagineuse (comme *MGP^{-/-}*) [194]. Il se peut que la présence d'autres inhibiteurs de la BMP-2, comme la MGP, permettent de prévenir une calcification artérielle plus importante et plus étendue chez ces souris. Il y a certainement une multitude de mécanismes encore inconnus pouvant expliquer l'hétérogénéité des effets de la BMP-2 et 7. Il a toutefois été suggéré que la BMP-2 est capable de lier le récepteur endoglin (un récepteur TGF- β de type III) mais pas la BMP-7 [195]. Il y a également le concept des corécepteurs de BMPR qui peut être spécifique pour l'une ou l'autre des BMPs [189]. Finalement, les voies de signalisation spécifiques des BMPs indépendantes des Smads pourraient être le concept de base pour expliquer la différence entre l'effet de la BMP-2 et 7 [196, 197].

Bone sialoprotein

La « *bone sialoprotein* » (BSP) originalement nommé BSP II est une glycoprotéine acide de la MEC synthétisée par les ostéoblastes et les ostéoclastes [198, 199]. Tout comme

l'OPN, la BSP contient des séquences RGD lui permettant d'interagir avec les intégrines pour réguler l'adhésion et la migration cellulaire. Par contre, contrairement à l'OPN qui est un inhibiteur de la calcification, la BSP est associée avec les phases précoces de la formation osseuse et agit comme un « nucléateur » de la formation d'hydroxyapatite, c'est-à-dire qu'il participe à la formation du noyau d'hydroxyapatite [200]. Même si en culture, les CMLVs expriment la BSP et que la BSP est régulé à la hausse dans les CMLVs par des facteurs qui induisent leur différenciation ostéoblastique, le vaisseau sain n'exprime que très peu de BSP. Cependant, l'expression de la BSP est fortement accrue dans la tunique médiale d'artères de patients atteints de sclérose de Mönckerberg (calcification artérielle médiale).

Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) est une glycoprotéine qui a 3 isoformes connues à ce jour : une placentaire, une autre présente dans les intestins, et la dernière se retrouve dans le foie, les os et le rein. La dernière isoforme est aussi exprimée dans une grande variété de tissus, dont les artères, les artérioles et les capillaires [201]. L'ALP est fortement induite dans les cellules ostéoblastiques différenciées et semble être impliquée dans la minéralisation osseuse [202]. L'ALP catalyse l'hydrolyse des monophosphate d'ester, comme le phosphoéthanolamine et le p-nitrophénylphosphate à un pH alcalin (10). Les phosphates clivés sont incorporés dans les cristaux d'hydroxyapatite. Le β -glycérophosphate est un substrat de l'ALP couramment utilisé comme supplément dans les milieux de culture pour les cellules osseuses, mais aussi pour induire la calcification de

CMLVs en culture [203]. L'ostéopontine qui est un inhibiteur de la calcification vasculaire lorsque phosphorylé [158], semble être un autre substrat pour l'ALP. Ainsi, l'ALP peut contrer les effets anti-calcifiants de l'OPN. L'inhibition de l'ALP par la chaleur, le beryllium ou le levamisole empêche la calcification des vésicules matricielles dans les tissus [204]. De plus, la surexpression de l'ALP induit une calcification dans des lignées cellulaires qui habituellement sont incapables de calcifier [205]. Finalement, certains facteurs associés aux maladies vasculaires comme le $\text{TNF-}\alpha$, le $\text{TGF-}\beta$ et la leptine augmentent tous l'activité de l'ALP dans les CMLVs [206-208].

Ostéocalcine

L'ostéocalcine est aussi appelée « *bone Gla protein* », elle contient 3 résidus Gla. Elle est la NCP liant la MEC la plus abondante au niveau de l'os. Cette protéine est exprimée par les ostéoblastes et est un précieux marqueur pour la différenciation de ces cellules. L'hypothèse selon laquelle il existe un lien entre le statut suboptimal de la vitamine K et l'ostéoporose est apparue il y a une vingtaine d'années alors qu'on a remarqué que les patients atteints d'ostéoporose avaient de faibles taux circulants de vitamine K [209]. Depuis, plusieurs études ont renforcé ce lien, spécialement la découverte que l'ostéocalcine peu γ -carboxylée est un prédicteur indépendant pour la réduction de la densité minérale osseuse et les risques de fracture à la hanche [210]. D'ailleurs une étude a démontré que des femmes d'âge moyen et âgées ayant une diète plus riche en vitamine K (cofacteur de l'enzyme responsable de la γ -carboxylation des protéines Gla) avaient des risques plus faibles de fracture à la hanche [211]. Cependant, les mécanismes par lesquels

l'ostéocalcine peu γ -carboxylée est relié à un défaut du métabolisme osseux n'est encore pas connu. Des analyses d'échantillons d'os de patients souffrants d'ostéoporose et d'autres de personnes en santé ne révèlent pas de différences significatives entre les taux d'ostéocalcine peu γ -carboxylée [212]. Comme l'ostéocalcine peu γ -carboxylée a moins d'affinité pour les minéraux osseux, cela peut servir à diminuer son importance relative dans le métabolisme de l'os [212]. Par contre, il est étonnant de constater que les souris déficientes en ostéocalcine présentent une augmentation de leur densité osseuse, suggérant un effet inhibiteur de l'ostéocalcine sur l'activité des ostéoblastes. De plus, elles ne montrent aucune calcification vasculaire [213]. Il se peut alors que l'ostéocalcine non γ -carboxylée, un produit direct des ostéoblastes, a plus d'effet inhibiteur sur la fonction des ostéoblastes que la forme γ -carboxylée [212]. Des études sur les propriétés fonctionnelles des deux formes d'ostéocalcine seront donc nécessaires afin de démystifier ce paradoxe.

Le promoteur du gène de l'ostéocalcine contient trois sites de reconnaissance pour le facteur de transcription cbfa-1. La mutation de ces trois sites engendre une baisse significative de l'expression de l'ostéocalcine *in vitro* [214]. Il existe un autre élément de réponse clé dans la régulation de l'expression du gène de l'ostéocalcine, il est reconnu par le récepteur de la vitamine D3. Cet élément de réponse favorise la transcription du gène de l'ostéocalcine.

Tableau 6. Médiateurs moléculaires de la calcification artérielle médiale.

Molécules	Effets sur la calcification vasculaire	Effet global
<i>Matrix Gla protein</i>	-Prévient la précipitation du calcium et inhibe la croissance des cristaux d'hydroxyapatite. -Lie et envoie les précipités de calcium dans la circulation. -Inhibe les effets de la BMP-2 (différentiation ostéoblastique des CMLVs).	Anti-calcifiante
Ostéopontine	-Important régulateur de la calcification vasculaire en condition pathologique (sa fonction précise n'est toujours pas définie). -Prévient la précipitation spontanée des sels de calcium. -Les phosphates sur l'OPN inhibent majoritairement la formation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite.	Anti-calcifiante
RANK/RANKL	-Favorise la résorption osseuse (souvent liée à la calcification vasculaire).	Pro-calcifiants
Ostéoprotégérine	-Inhibe la liaison de RANKL à son récepteur RANK et ainsi empêcher la résorption osseuse (et donc la calcification vasculaire). -Rôle encore inconnu dans les vaisseaux sanguins.	Anti-calcifiante
Ostéonectine	-Inhibe la formation des cristaux d'hydroxyapatite.	Anti-calcifiante
<i>Cbfa-1</i>	-Induit un changement phénotypique des CMLVs vers un phénotype mimant celui des ostéoblastes (cellules impliquées dans la minéralisation osseuse).	Pro-calcifiant
<i>BMP-2</i>	-Stimule l'expression du facteur de transcription <i>Cbfa-1</i> (induit un phénotype ostéoblastique). -Peut augmenter l'apoptose des CMLVs (l'apoptose semble être une étape critique dans l'initiation et la propagation de la calcification).	Pro-calcifiante
<i>BMP-7</i>	-Induit un phénotype vasculaire en augmentant l'expression des Smads 6-7 connus pour inhiber les effets de <i>BMP-2</i> .	Anti-calcifiante
<i>Bone sialoprotein</i>	-Initie la formation d'hydroxyapatite (mécanisme pas encore bien défini).	Pro-calcifiante
Phosphatase alcaline	-Contre les effets anti-calcifiants de l'OPN en clivant ses phosphates. -Peut induire la calcification de lignées cellulaires normalement incapable de calcifier.	Pro-calcifiante
Ostéocalcine	-C'est un marqueur pour la différenciation des ostéoblastes, mais les souris déficiente en ostéocalcine présentent une augmentation de leur densité osseuse sans calcification vasculaire.	?

Abbreviations : RANK, receptor activator of nuclear factor κ B; RANKL, receptor activator of nuclear factor κ B ligand; Cbfa-1, Core binding factor alpha-1; BMP, Bone morphogenic protein; OPN, ostéopontine, CMLV, cellule du muscle lisse vasculaire.

iii. Homéostasie du calcium

Le calcium régule plusieurs fonctions physiologiques vitales (division cellulaire, contraction musculaire, métabolisme du glycogène, sécrétion hormonale, coagulation...). Ainsi, les concentrations cytosolique et extracellulaire de calcium sont contrôlées de manière rigoureuse. La grande variabilité quotidienne de la consommation de calcium (via la diète) chez l'homme nécessite des mécanismes physiologiques permettant d'éviter les déficiences ou les excès extrêmes de calcium dans le sérum. L'hormone parathyroïdienne (PTH) et la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D) sont deux molécules qui régulent les concentrations de calcium dans le sérum. Lors d'une baisse de la calcémie, la PTH stimule la relâche de calcium des os, sa réabsorption par le rein et stimule la synthèse de la 1,25(OH)₂D par le rein. La 1,25(OH)₂D augmente l'absorption du calcium par les intestins. Lorsque les taux de calcium sont à nouveau normaux, ces différentes actions sur les os, le rein et les intestins sont inhibées par une boucle de rétroaction négative [215].

Il est important de comprendre que les concentrations physiologiques de calcium et de phosphate dans le milieu extracellulaire de la paroi vasculaire suffisent à la cristallisation sous forme d'hydroxyapatite de manière spontanée, suggérant que des influences anti-calcifiantes prédominent en condition normale. Plusieurs modèles animaux nous ont permis d'identifier des gènes qui en perdant leur fonction rendent les artères plus

susceptibles à la calcification. Ces études ont ainsi permis d'identifier plusieurs protéines pro et anti-calcifiantes. Ainsi, toutes ces données ont permis de renforcer la théorie selon laquelle la calcification des tissus mous (incluant les artères) est finement régulée par une balance entre des inducteurs et des inhibiteurs de calcification.

iv. Résorption osseuse

Dans la littérature, plusieurs articles démontrent que l'on peut prévenir l'élastocalcinose par différents traitements pharmacologiques [33, 216, 217]. Par contre, très peu d'études démontrent que ce processus peut être réversible [218, 219]. Il est toutefois connu que la biominéralisation est un phénomène réversible, ce qui est d'ailleurs observé continuellement au niveau des os (résorption osseuse). Les cellules responsables de cette « décalcification » sont les ostéoclastes. Tout au long de la vie, les os subissent un remodelage afin de les renforcer et de les réparer lors de légers bris ou de fractures. La balance ostéoblastes/ostéoclastes est donc essentielle pour l'intégrité des os. En effet, s'il y a un manque d'ostéoblastes (ou un surplus d'ostéoclastes), les os se fragilisent et on observe de l'ostéoporose. Par contre, si les ostéoblastes sont en surplus (ou un manque d'ostéoclastes), on observe alors de l'ostéopétrose.

Les ostéoclastes sont des cellules multi-nucléées, créées par la différenciation des monocytes-macrophages à la surface des os ou à proximité. Le contact entre les cellules stromales et celles de la moelle osseuse est essentiel pour induire l'ostéoclastogénèse. Ceci suggère que des facteurs dérivés des cellules stromales stimulent ce processus. En effet, le

RANKL (*receptor activator of nuclear factor κ B ligand*) et le facteur de croissance CSF-1 (*colony-stimulating factor-1*) sont nécessaires pour induire l'expression de gènes codant pour des protéines caractéristiques des ostéoclastes (TRAP, cathepsine K, intégrine- β_3) menant au développement d'ostéoclastes matures. La membrane des ostéoclastes est polarisée, et en réponse à l'activation de RANK par son ligand, un réarrangement de l'actine s'effectue. Il y a formation de liens serrés entre la surface osseuse et la membrane basale des ostéoclastes créant une « vacuole » externe. Les ostéoclastes dégradent les os via la sécrétion massive d'acide (HCl). Pour ce faire, ils produisent une grande quantité de protons grâce à l'anhydrase carbonique II. Cette enzyme, présente dans le cytoplasme des ostéoclastes, hydrate le CO_2 pour produire des protons et du HCO_3^- . Les protons sont expulsés de la cellule par des pompes à protons ATPasiques de type V polarisées d'un seul côté de la cellule (membrane basale). L'activité massive d'une pompe ATPasique requiert une grande quantité d'énergie, c'est pourquoi les ostéoclastes contiennent un grand nombre de mitochondries. La source d'énergie pour la sécrétion d'acide est presque exclusivement le glucose. Le HCO_3^- est quant à lui expulsé de la cellule par un échangeur qui fait alors entrer du Cl^- . Cet échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ est situé à l'opposé des pompes à protons, sur la membrane basolatérale. Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, le Cl^- sort de la cellule par un canal situé du même côté que les pompes à protons. Un milieu acide (pH entre 4 et 5) sera alors créé dans la « vacuole » externe et cela permettra de dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite [220] (voir Figure 11). De plus, les ostéoclastes sécrètent des procollagénases et de la cathepsine dans la « vacuole » externe afin de venir dégrader la

matrice osseuse (principalement du collagène). Les divers produits de dégradation de la résorption osseuse serait pris en charge par l'ostéoclaste lui-même par une transcytose vésiculaire.

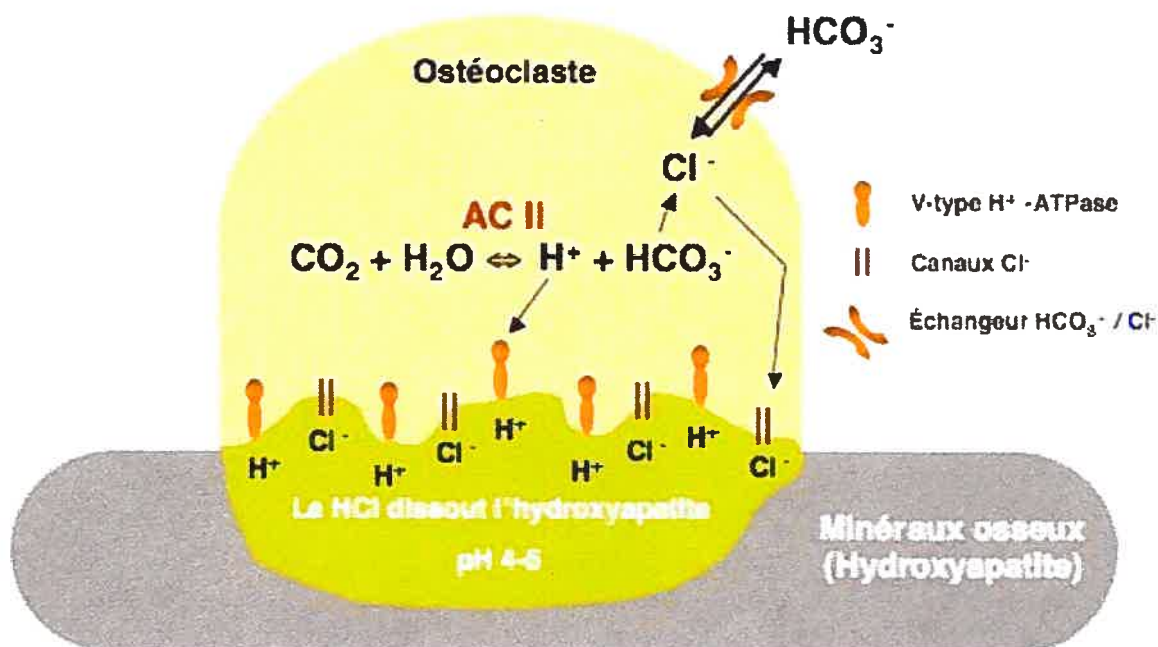


Figure 12. Représentation schématique de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite de la matrice osseuse par les ostéoclastes et rôle de l'anhydrase carbonique II (AC II) dans un ostéoclaste.

Les ostéoclastes consomment beaucoup d'énergie (ATP) afin de produire une sécrétion d' HCl soutenue engendrant la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{CaOH}_2$) en calcium, eau et phosphate. La phosphorylation oxydative du glucose est la principale source d'énergie des ostéoclastes (non représentée dans le schéma). Par l'hydratation du CO_2 , l'anhydrase carbonique II produit des protons qui seront expulsés de la cellule par des pompes ATPasiques de type V polarisées d'un seul côté de la cellule. Le HCO_3^- est quant à lui expulsé de la cellule par un échangeur qui fait alors entrer du Cl^- . Cet échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ est situé à l'opposé des pompes à protons, sur la membrane basolatérale. Afin de maintenir l'homéostasie, le Cl^- sort de la cellule par un canal situé du même côté que les pompes à protons. Ainsi une poche acide (pH 4-5) est créée dans la matrice osseuse. Adapté de Blair HC. 1998, BioEssays [220].

v. *Liens entre la résorption osseuse et la calcification vasculaire*

La calcification vasculaire et l'ostéoporose (résorption osseuse) sont fréquemment observées ensemble et partagent plusieurs facteurs de risque similaires (ex; l'âge, la déficience en oestrogène, l'utilisation des glucocorticoïde et l'insuffisance rénale) [221]. Les patients atteints d'ostéoporose ont une incidence plus élevée de calcification artérielle. De manière réciproque, des études épidémiologiques montrent que l'incidence d'ostéoporose est augmentée chez les gens avec de l'athérosclérose ou de la calcification aortique. En fait, la progression de la calcification vasculaire se produit souvent de manière parallèle à la perte de la densité osseuse chez les femmes post-ménopausées [222]. Certains agents connus pour inhiber la résorption osseuse comme les biphosphonates et l'OPG, peuvent aussi prévenir la calcification artérielle chez le rat [217, 223]. De ces résultats, il a été proposé qu'un déséquilibre dans la localisation du calcium permet son mouvement de l'os vers la paroi vasculaire via des mécanismes impliquant l'OPG [224].

Bucay et al ont montré qu'en plus de présenter de l'ostéoporose, le 2/3 des souris déficientes en OPG exhibent une calcification médiale de l'aorte et de l'artère rénale, sites endogènes d'expression abondante d'OPG chez la souris normale [225]. Les auteurs suggèrent que l'OPG joue normalement un rôle important dans la protection vasculaire *in vivo* et qu'il pourrait représenter un facteur liant l'ostéoporose et la calcification vasculaire. La perte de l'OPG dans la paroi vasculaire mènerait ultimement à une synthèse protéique

anormale (synthèse de protéines de type ostéoblastiques) par les CMLVs de manière à favoriser la déposition de calcium dans la MEC [224, 225]. Des études ont ensuite montré que l'administration chronique d'OPG de la gestation jusqu'à l'âge adulte chez ces souris déficientes en OPG permettait de prévenir la calcification vasculaire. Par contre, lorsque l'OPG est donné seulement après l'apparition de la calcification artérielle, aucun effet n'est observé [226].

vi. Rôle de l'endothéline dans la calcification

Au niveau vasculaire, peu d'études démontrent un rôle de l'ET dans l'élastocalcinose, par contre, plusieurs articles tentent de démontrer un rôle important de l'ET dans le remodelage osseux (calcification et « décalcification » des os). L'ET est synthétisée par les cellules osseuses, et ses récepteurs, ET_A et ET_B, ont été détectés sur les cellules ostéoblastiques [227]. Ainsi plusieurs effets de l'ET ont été observés dans les os : l'activation des phospholipases A, B et C, la stimulation d'un flux calcique des compartiments intra et extracellulaire et l'activation des tyrosine kinases [227]. L'ET induit aussi des changements phénotypiques telles que des variations de l'activité de la phosphatase alcaline, la stimulation de l'OPN et de l'ostéocalcine, la synthèse de collagène et de NCP, l'inhibition de la motilité des ostéoclastes et la stimulation de la résorption osseuses dépendante des prostaglandines [227]. D'autres études montrent que l'ET induit la prolifération et la différenciation ostéoblastique [228]. Bref, toutes ces actions de l'ET dans les os pourraient laisser entrevoir un rôle potentiel de l'ET dans la calcification vasculaire.

D'ailleurs, une étude montre que l'expression vasculaire de la BMP-2, de la BMP-7 et du récepteur de type II de BMP (protéines impliquées dans la calcification) double chez des souris non-obèses diabétiques comparativement à des souris témoins [229]. Un antagoniste du récepteur ET_A de l'ET a permis de prévenir cette surexpression de BMP-2, BMP-7 et du récepteur de type II de BMP dans l'aorte [229], suggérant que l'ET peut interférer dans la synthèse de protéines impliquées dans la calcification vasculaire. De plus, l'ET-1 a été reconnu comme un régulateur de la calcification vasculaire dans un modèle *in vitro* et chez les rats VDN [230]. En effet, des antagonistes des récepteurs de l'ET ont permis de prévenir et/ou d'atténuer la calcification vasculaire dans ces deux modèles [230]. En résumé, il semble que l'ET soit impliqué dans la calcification vasculaire et que sa modulation peut interférer dans ce processus

vii. Modèles de calcification artérielle médiale

Calcification vasculaire *in vitro*

Comme il existe, chez l'homme, une corrélation entre l'hyperphosphatémie et la calcification vasculaire, certains chercheurs ont alors examiné l'effet du β -glycérophosphate et du phosphate inorganique sur la régulation de la minéralisation des CMLVs en culture. D'une part, Shioi et al ont montré que l'ajout de β -glycérophosphate dans le milieu de culture de CMLVs bovines engendrait une calcification de ces dernières (formation de cristaux d'hydroxyapatite dans la MEC). De plus, cette calcification vasculaire était dépendante de l'activité de la phosphatase alcaline tel que démontré par

l'ajout de levamisole, un inhibiteur de cette enzyme [203]. D'autre part, Jono et al ont montré que l'ajout de phosphate inorganique pouvait également entraîner une calcification de CMLVs en culture [231]. Ces modèles peuvent être de bons outils pour étudier les mécanismes moléculaires de la calcification vasculaire, je m'attarderai toutefois plus à l'utilisation de modèles de calcification vasculaire chez l'animal afin d'étudier également les paramètres hémodynamiques.

Souris MGP déficientes

Les souris déficientes en MGP développent une très forte calcification médiale de l'aorte et de ses branches [137]. En fait toutes les artères élastiques et musculaires sont atteintes, cependant les artérioles, les capillaires et les veines ne sont pas calcifiés. À une semaine de vie, les souris MGP^{-/-} ne sont pas différentes des souris sauvages [137]. Par contre, à 2 et 3 semaines, la coloration von Kossa (révélation des sels de calcium : phosphate, carbonate, sulfate et oxalate) montre une calcification des lamelles élastiques dans la tunique médiale de la paroi aortique et une déformation de leur architecture [137]. De plus, les coronaires ainsi que les valves aortiques sont calcifiées [137]. Ces souris meurent en moyenne après seulement 2 mois de vie en raison d'une dissection de l'aorte devenue pratiquement un os [137]. Ce modèle animal prouve que la MGP joue un rôle important dans la prévention de la calcification artérielle médiale.

Rats warfarine/vitamine K

Comme mentionné précédemment, la MGP est une protéine qui doit être γ -carboxylée afin de pouvoir lier l'hydroxyapatite et ainsi prévenir la calcification artérielle médiale. Cette γ -carboxylation est catalysée par l'enzyme γ -glutamate carboxylase qui est vitamine K dépendante. La vitamine K hydroquinone est la forme de vitamine K biologiquement active et utilisée par la γ -carboxyglutamase. Elle se transforme en vitamine K époxyde suite à la réaction enzymatique. Pour que la vitamine K hydroquinone soit régénérée, la forme époxyde doit être réduite par l'enzyme KO réductase pour former la vitamine K quinone qui sera à son tour réduite par la K réductase, ce qui reformera alors la vitamine K hydroquinone (voir Figure 12). La warfarine inhibe autant la KO réductase que la K réductase ce qui empêche la régénération de la vitamine K hydroquinone et ainsi la γ -carboxylation de la MGP qui ne pourra plus lier l'hydroxyapatite. Le groupe de Price a montré que l'administration chronique de warfarine chez le rat permettait d'induire la calcification des lamelles élastiques de la tunique médiale des artères élastiques et musculaires et des valves aortiques [232]. Au niveau de l'aorte, 4 semaines de traitements warfarine/vitamine K (WVK) augmentait d'environ 4 fois les taux de calcium tissulaire [232].

Comme les facteurs de coagulation au niveau du foie ont besoin de vitamine K hydroquinone pour leur synthèse, l'administration concomitante de vitamine K phylloquinone (extraite de végétaux) est nécessaire afin de prévenir les hémorragies et la

mort de l'animal. Mais comment expliquer que cette vitamine K phylloquinone peut être réduite au niveau du foie et pas au niveau vasculaire, puisqu'il y a élastocalcinose malgré son administration. Wallin et al. ont montré que la DT-diaphorase, une enzyme capable de réduire la vitamine K phylloquinone, est 100 fois plus active dans le foie que dans les artères expliquant ce paradoxe [233].

De surcroît, le traitement WVK induit une élévation des taux d'ARNm et de protéines de la MGP dans les artères calcifiées, mais les taux de MGP sont diminués dans le sérum [232]. Ces résultats pourraient suggérer que les artères tentent de limiter ou freiner leur calcification en produisant plus de MGP. Ce traitement n'affecte toutefois pas la croissance osseuse, le gain de poids, la calcémie ou la phosphatémie [232].

Rats vitamine D3/nicotine

En 1985, Fleckenstein et al. ont montré que les rats traités avec de la vitamine D3 et de la nicotine (VDN) présentent une calcification artérielle médiale. Mais les doses élevées de nicotine et vitamine D3 provoquaient la mort prématurée des rats, soit après seulement 6 jours de traitement [234]. Ce n'est qu'en 1990, que le groupe d'Atkinson reprend le modèle afin de le rendre plus viable. Ainsi en donnant une dose unique de vitamine D3 et des doses plus faibles de nicotine, ils ont mis au point un modèle d'élastocalcinose chez le rat [235]. Ce modèle animal de calcification artérielle médiale joue cette fois sur les taux de calcium dans le sang et non pas sur les molécules anti-calcifiantes comme la MGP. Effectivement, la vitamine D₃ provoque une hypercalcémie temporaire même lorsque les rats sont nourris

avec une diète dépourvue de calcium. De son côté, la nicotine potentialise l'accumulation de calcium en augmentant la libération de Ca^{2+} intracellulaire et/ou en stimulant la libération de catécholamines (il a été montré que des injections répétées d'épinéphrine induisent une calcification artérielle médiale) [235]. Ainsi, une surcharge calcique se produit au niveau vasculaire et il semble que les défenses anti-calcifiantes ne sont plus suffisantes pour empêcher la nucléation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite dans la paroi artérielle. En effet, un jour après la dernière injection de nicotine (de 8), une surcharge calcique très marquée est observée dans le système cardiovasculaire. Chez les rats VDN, il y a une forte augmentation du contenu en calcium dans l'aorte (20 à 30 fois plus comparativement aux rats témoins), les reins et le myocarde, mais pas dans le foie ou le cerveau [235]. Il est à noter que le traitement VDN a engendré environ 17% de mortalité chez le rat. Les rats VDN sont utilisés comme modèle expérimental d'HSI.

Rats âgés

Tout comme chez les humains, les parois artérielles de rats de différentes souches se calcifient avec l'âge [236]. Effectivement, une étude de Kieffer et al. a montré que le contenu en calcium dans l'aorte thoracique des rats Wistar, Wistar Kyoto, Fisher 344 et SHR augmentait d'environ 2,5 fois entre l'âge de 6 et 30 mois. Toutefois, le ventricule gauche et le foie ne calcifiaient pas [236]. La calcification artérielle médiale ne fut pas amplifiée par l'hypertension (rats SHR comparés aux autres souches normotensives) contrairement à ce qui est observé dans certaines études [237]. Le rat âgé est un bon

modèle d'élastocalcinose et de vieillissement, il est toutefois onéreux et peu flexible pour ce qui est des études de régression.

Avantages et inconvénients des différents modèles de calcification vasculaire

Le tableau qui suit dresse un bilan, avantages et inconvénients, des différents modèles de calcification artérielle médiale chez l'animal.

Tableau 7. Bilan des modèles de calcification vasculaire.

Modèles	Avantages	Inconvénients
Vieillessement (rats)	•Proche de la réalité	•Couteux •Peu flexible
Rats VDN	•Flexible (Étude prévention et régression)	•Mécanisme non spécifique •Calcification exagérée
Souris MGP -/-	•Mécanisme spécifique	•Lien avec la pathologie humaine incertain •Calcification exagérée
Rats WVK	•Flexible •Mécanisme endogène	•Lien avec la pathologie humaine incertain

Abbreviations : VDN, vitamine D / nicotine; MGP, *matrix GLA protein*; WVK, warfarine / vitamine K.

1.3. Hypothèse et objectifs généraux

En résumé, l'HSI est un facteur de risque important quant à la morbidité et la mortalité cardiovasculaires, surtout dans la population vieillissante. Malheureusement, les traitements actuels sont inadéquats et peu efficaces. En effet, les anti-hypertenseurs diminuent autant la PAS que la PAD et donc la PAM. Il serait plus indiqué de diminuer seulement la PAS pour avoir un impact significatif sur la PP et l'HSI où la PAM n'est pas augmentée. L'élévation de la rigidité des gros troncs est la principale cause du développement de l'HSI (augmentation de la PAS et de la PP). Cette rigidité peut être la conséquence entre autres de la fragmentation des lamelles élastiques, de l'augmentation du matériel rigide de la MEC et de l'élastocalcinose (calcification vasculaire médiale). Les causes du développement de l'élastocalcinose peuvent être multiples et elles ne sont pas encore bien définies. Plusieurs molécules endogènes sont connues pour être pro-calcifiantes alors que d'autres sont anti-calcifiantes. La balance entre ces protéines est alors cruciale pour garder l'intégrité de la paroi vasculaire (sans calcification). De plus, l'ET semble avoir un effet sur l'élastocalcinose en modulant certaines de ces molécules. Ainsi, l'hypothèse générale de mon doctorat est que des modulateurs de l'ET peut régresser l'élastocalcinose et diminuer spécifiquement la PAS et la PP dans un modèle d'HSI.

Dans le but de prouver cette hypothèse, mes travaux se sont articulés autour des objectifs généraux suivants :

1. Établir un modèle *in vivo* d'hypertension systolique isolée basé sur la calcification médiale des artères de conductance.
2. Caractériser ce modèle d'HSI (changements phénotypiques des CMLVs associés à la calcification artérielle médiale et impact sur le système cardiovasculaire).
3. Voir les effets d'anti-hypertenseurs (ETRA, BCC) sur ce modèle d'HSI au niveau de la calcification vasculaire, de la rigidité artérielle et des paramètres hémodynamiques.
4. Étudier les mécanismes impliqués dans la régression de l'élastocalcinose induite par un ETRA dans ce modèle d'HSI.
5. Étudier les effets distincts d'un BCC sur l'élastocalcinose et la rigidité aortique dans ce modèle d'HSI.

Globalement, mon doctorat avait pour but de régresser l'élastocalcinose afin d'améliorer la compliance des gros troncs artériels pour ultimement trouver un traitement plus ciblé et adéquat de l'hypertension systolique isolée.

Chapitre 2. A New Model of Isolated Systolic Hypertension Induced by Chronic Warfarin and Vitamin K₁ Treatment

American Journal of Hypertension, 2003;16:103-110

Rachida Essalihi B.Sc., Huy Hao Dao B.Pharm., M.Sc.,
Nobuharu Yamaguchi B.Pharm., Ph.D., and Pierre Moreau B.Pharm., Ph.D.

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Short Title : Essalihi et al. Experimental model of ISH

Sources of Support :

RE and HHD receive a stipend from the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome and the Fonds canadien pour l'avancement de la recherche, respectively. PM is a scholar of the Canadian Institutes for Health Research. Funding was provided by the Canadian Institutes for Health Research. Note: the first two authors contributed equally to the manuscript.

Address for correspondence :

Pierre Moreau, Ph.D.
Associate Professor, Faculty of Pharmacy
Université de Montréal
2900 Édouard-Montpetit, Room R-313
P.O. Box 6128, Stn « Centre-Ville »
Montréal, Québec
H3C 3J7 Canada

Phone : (514) 343-6111 x3342

Fax : (514) 343-2102

e-mail : [REDACTED]

2.1. Abstract

Background: Isolated systolic hypertension is the predominant form of hypertension in the elderly population. Reduction of arterial compliance appears to contribute to the elevation of pulse pressure and among potential mechanisms, gradual vascular calcification, fragmentation of elastic lamellae and augmentation of rigid component like collagen could contribute to increase aortic stiffening. Few experimental models of the disease are currently available.

Methods: In order to induce large artery calcification, rats were treated with warfarin and vitamin K₁ (WK) for 4 and 8 weeks, to inhibit the maturation of matrix Gla protein. The impact of chronic pulse pressure elevation was determined on large artery and cardiac remodeling and on aortic endothelial function.

Results: The WK treatment led to aortic medial calcification and a proportional elevation of PP, attributable mainly to a selective elevation of systolic blood pressure. The chronic treatment also increased collagen while elastin decreased in the aorta. Pulse-wave velocity, an index of aortic stiffening, increase in rats treated with WK. However, indices of left ventricular and aortic hypertrophy and remodeling remained normal. In addition, the WK treatment did not modify the vasoconstriction to norepinephrine and endothelin-1, and the vasodilatory response to acetylcholine and sodium nitroprusside.

Conclusion: Chronic treatment with WK represents a new model of isolated systolic hypertension with several characteristics of the human disease. The relative ease to induce calcification in this model may help to foster more fundamental research, which is lacking in this type of hypertension

Keywords: arterial compliance, matrix Gla protein, vascular calcification, pulse pressure, extracellular matrix

2.2. Introduction

Brachial systolic blood pressure (SBP) increases linearly from adolescence through old age. However, brachial diastolic blood pressure (DBP) increases concomitantly only until age 50 to 60, when it levels off before declining. Thus, pulse pressure (PP) increases slowly in the sixth decade and more steeply afterwards, while mean arterial pressure (MAP) tends to normalize, leading to isolated systolic hypertension (ISH)^{1,2}. Pulse pressure elevation is now recognized as an independent risk factor for coronary heart disease and mortality^{3,4}. Elevation of PP can be explained by a gradual stiffening of large arteries, secondary to the presence of structural and functional abnormalities of the aortic wall, involving calcification of the elastic lamellae, fragmentation of elastic fibers, and increased collagen deposition^{2,5}.

In the context of atherosclerosis, calcification occurs in association with lipid-laden foam cells in the intima and is thus focal and occurs late in the disease process⁶. However, the form of calcification associated with normal aging, and accelerated by diabetes mellitus and end-stage renal disease (ESRD)^{7,8}, is characterized by diffuse mineral deposition in the media of the vessel, and more specifically on the elastic lamellae (often referred to as Mönckeberg's sclerosis)⁷. There are presently few models of medial calcification and working with very old animals is costly and does not allow sufficient experimental flexibility, although such studies have shown modest increase in vascular calcium

deposition⁹. This may explain the lack of fundamental research in this important paradigm, as compared to the overwhelming epidemiological and clinical data.

Medial calcification can be induced by vitamin D and nicotine administration (VDN) and this treatment produces a model of ISH^{10,11}. However, it is not clear how this model relates to the human pathophysiology of aging-induced (and pathology-accelerated) medial calcification, as S-100, a calcium-binding protein, is overexpressed in this model and in human atherosclerotic lesions¹². Matrix Gla protein (MGP) is among the numerous proteins suggested as potential endogenous calcification inhibitors¹³. It is a 10 KDa mineral-binding extra-cellular matrix (ECM) protein synthesized by many tissues including vascular smooth muscle cells (VSMC), contributing to maintain an uncalcified ECM¹⁴. Gla residues are added to the protein by the action of the vitamin K-dependent enzyme γ -carboxylase on certain glutamic acid residues¹⁵. Gla residues bind to calcium hydroxyapatite and are believed to limit calcium salt precipitation in the ECM^{16,17}. If the regeneration of the biological active form of the co-factor vitamin K is inhibited by warfarin, Gla residues are not added to MGP and it fails to bind calcium. Thus, focal calcification of the elastic lamellae in the media of major arteries ensues¹⁸ (see¹⁵ for review). Interestingly, MGP is co-localized with elastic fibers and its amount decreases in calcified lesions and relocates near calcified areas^{19,20}. It has also been proposed that MGP may bind other matrix proteins involved in calcification, such as BMP-2¹³. Nonetheless, mice that lack MGP develop to term, but die within 2 months as a result of massive arterial calcification which leads to aortic rupture¹⁴.

The aims of the present study were 1) to determine if aortic calcification induced by warfarin in rats generates a reproducible and convenient experimental model of ISH, and 2) to evaluate the impact of such treatment on vascular reactivity and cardiovascular remodeling.

2.3. Methods

2.3.1. Animals and experimental design

Age-matched control male Wistar rats (initial weight of 175-200g or 6-7 weeks of age, Charles-River, St-Constant, Québec) were compared to rats receiving warfarin ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, in the drinking water) and vitamin K₁ (phyloquinone, $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ s.c.) for 4 weeks or 8 weeks (WK4 and WK8). Vitamin K₁ was started one week prior to warfarin, and the dosing of warfarin was adjusted every second day by monitoring the volume drank. Each of the 4 groups contains at least 10 rats. Animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

2.3.2. Hemodynamic parameters

At the end of treatments, animals were anesthetized (pentobarbital $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) and a short PE-50 catheter was inserted into the left femoral artery and pushed into the distal abdominal aorta. The catheter was connected to a pressure transducer to allow the measurement of DBP, SBP and heart rate (HR). Mean arterial pressure, and PP were calculated from these values. The same catheter was also used to collect arterial blood for

catecholamines and renin activity measurements. Finally, the carotid arteries, the aorta, the heart and one kidney were harvested.

In an additional six control and WK4 rats, pulse-wave velocity (PWV) was measured as follows. Rats were anesthetized (pentobarbital $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.p.) and a polyethylene catheter (PE50 welded to an intravascular PE10 segment) was inserted in the aortic arch via the left carotid artery. A PE50 catheter was inserted in the distal abdominal aorta via the left femoral artery. Pulse waves were recorded at a sampling rate of 500Hz. At the end of the experiment, animals were killed and the aorta fully exposed. The distance between the catheter tips was measured (l) and PWV was calculated by dividing the propagation distance (l) by the propagation time (t), in units of centimeters per seconds. The manual foot-to-foot technique was used to determine the propagation time as previously described²¹. At least ten normal consecutives waveforms were individually analyzed and averaged. If an abnormal waveform (irregular or incomplete) was detected within the ten cardiac cycles, it was rejected and the next was measured.

2.3.3. Cardiovascular structure and composition

At the end of hemodynamic measurements, carotid arteries, a portion of thoracic aorta, the heart and one kidney were harvested, weighed and frozen at -80°C for subsequent calcium measurement. A small portion (5mm ring) of the thoracic aorta and a transversal slice through the middle of the heart were immediately fixed in phosphate-buffered paraformaldehyde 4%, embedded in paraffin blocks and $4 \mu\text{m}$ thick slices were stained

with hematoxylin and eosin (H&E) for structure determination. In the aorta, medial cross-sectional area (CSAm), internal lumen diameter (ID), external diameter (ED), and ratio of media thickness to lumen diameter (M/L)), were calculated from surface measurements, as previously described ²². Determination of cell number (by the 3D dissector method), collagen and elastin in the aortic media was also made with published methods ²². Adjacent 4 μm thick slices were stained with the von Kossa protocol to localize calcium deposition. Morphometric measurements in the heart (left ventricle (LV) area and wall thickness) were also done on digitized images and normalized by body weight (BW).

Calcium was determined in thoracic aortic segments, carotid arteries, small arteries of the mesenteric bed and a part of left ventricle and left kidney. Tissues were dried at 55°C in heating blocks, extracted with 10% formic acid (30 $\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ of dried tissue) overnight at 4°C and calcium levels were determined by colorimetry through a reaction with o-cresolphthalein complexon (Sigma Chemical Co.).

2.3.4. Plasma catecholamines and renin activity

Prior to sacrifice, a blood samples of 1 mL was collected in a tube containing 20 μL of a preservative solution (pH 6.5) containing EGTA (95 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and reduced glutathion (60 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) to determine the plasma concentration of catecholamines as previously described ²².

Plasma renin activity (PRA) was measured in unextracted plasma with the angiotensin I [^{125}I] radioimmunoassay kit (NEN Life Science Products, Boston, MA), according to instructions supplied by the manufacturer.

2.3.5. *Ex vivo* vascular reactivity

Additional control and WK8 rats (n=4 in each group) served to evaluate vascular reactivity. After sacrifice, the aorta was immediately placed into cold (4°C) Krebs-Ringer solution (composition in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: NaCl 118.6, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25.1, EDTA 0.026 and glucose 10.1), freed from surrounding tissues and cut into 4 mm long rings. The aortic rings were mounted horizontally between two stirrups in organ chambers filled with 20 mL of Krebs-Ringer solution (37°C; 95% O_2 /5% CO_2). One stirrup was connected to an anchor and the other to a force transducer connected to a data acquisition system. After an equilibrium period of 30 minutes, rings were gradually stretched and contracted with KCl (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) diluted in modified Krebs-Ringer solution (composition in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: NaCl 23.0, KCl 100.0, CaCl_2 2.5, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25.1, EDTA 0.026 and glucose 10.1). The maximal KCl response was obtained at an isometric tension of 4.0 g, at which the aortic rings were studied.

For endothelium-dependent relaxations, the aortas were precontracted with norepinephrine (NE, 10^{-7} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and then relaxed with acetylcholine (10^{-9} to 10^{-4} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). To evaluate the endothelium-independent relaxation of vascular smooth muscle cells, the aortic rings were precontracted with NE (10^{-7} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and then relaxed with

sodium nitroprusside (10^{-10} to 10^{-5} mmol•L⁻¹). Aortic contractions response curves to cumulative concentrations of NE (10^{-10} to 10^{-5} mol•L⁻¹) and endothelin-1 (10^{-10} to 10^{-7} mmol•L⁻¹) were also constructed. Data are presented as the maximal effect and the concentration of the substance producing a 50% contraction or relaxation (EC₅₀, expressed as negative log mol•L⁻¹), as determined by sigmoid curve fitting (Deltagraph).

2.3.6. Drugs and Statistical analysis

All drugs were purchased from Sigma Chemical Co., unless specified. Values are expressed as mean ± SEM. Statistical comparisons were performed by unpaired t-tests and a *P* value lower than 0.05 was considered significant.

2.4. Results

2.4.1. Hemodynamic parameters, weight and cardiac remodeling

Treatment of rats with WK for 4 and 8 weeks significantly increased PP in the distal abdominal aorta, which was due to a selective elevation of SBP with a small but not significant reduction of DBP (**Figure 1A**). More centrally, a non-significant increase in SBP and decrease in DBP contributed to elevate pulse pressure at 4 weeks in carotid arteries (**Table 1**). Moreover, MAP and HR were unchanged in the WK group at 4 and 8 weeks (**Figure 1B and Table 1**). Pulse wave velocity, an index of aortic stiffness, was 1,6 fold higher in the WK4 group as compared to Ctl4 group (**Figure 1C**). Treated rats had a transient reduction in body weight, with a normal body weight gain (**Table 1**). All indices

of cardiac or left ventricular hypertrophy (LVH) and remodeling, including HW/BW, LVW/BW and LVthickness/BW, were not altered by 4 or 8 weeks of treatment (**Table 1**)

2.4.2. Calcium content in tissues

Treatment with WK induced aortic and carotid calcification after 4 and 8 weeks, as shown by the respective 10 and 15 fold increase in vascular calcium content (**Figure 1D and 1E**). Interestingly, the amount of calcium accumulation seemed to reach a plateau after 4 weeks of treatment. Von Kossa staining revealed that aortic calcification was most prominent in medial elastic lamellae, with a patchy distribution and more frequent staining of lamellae adjacent to the adventitia (representative picture of WK8, **Figure 2**). A positive significant correlation ($r = 0.71$, $P < 0.01$; $r^2 = 0.51$) was found between aortic medial calcification and augmentation of PP among the four groups studied (**Figure 1F**). In contrast to large conduit arteries, we could not detect any change of calcium content in the left ventricle, the whole kidney and in small mesenteric arteries (**Table 1**).

2.4.3. Structure, collagen and elastin content of aorta

Treatment with WK for 4 and 8 weeks did not modify the structure of aorta. Indeed, ID, ED and CSAm were unaffected (**Table 2**). Therefore, M/L an index of remodeling, was not modified. In addition, the number of cells in the aortic wall was not altered in the treated groups as compared to control groups. The elastin and collagen area in the aortic wall was not significantly affected. However, the collagen/elastin ratio (C/E) ratio was

significantly increased after 4 and 8 weeks of WK treatment, due to a significantly decrease of elastin proportion and a tendency for collagen proportion to increase (**Figure 3**).

2.4.4. Vascular reactivity

Vasoconstriction to KCl was significantly reduced in the WK8 rats (**Table 3**). However, contractions to NE and to ET-1, expressed as % of KCl contraction (**Table 3**) or not (data not shown), were similar. The endothelium-dependent and independent vasodilation of aortic rings induced by acetylcholine and sodium nitroprusside, respectively were not altered by chronic WK treatment.

2.4.5. Plasma catecholamines and renin activity

The plasma concentrations of NE and epinephrine (E) were not significantly modified after 4 weeks of WK treatment (209 ± 21 and 61 ± 15 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, as compared to control values: 307 ± 55 and 53 ± 6 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$). In contrast, PRA was significantly lower in WK4 than in control rats (12.1 ± 1.4 and 18.3 ± 1.6 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ hrs}^{-1}$, respectively, $P < 0.05$).

2.5. Discussion

Our hemodynamic evaluation of the WK model of large artery calcification suggests that it represents a convenient and reproducible model of ISH, with several characteristics similar to the human form of the disease. Indeed, an elevation of SBP was observed without significant changes of MAP³. Our adaptation of the WK model suggested by others¹⁸,

where daily injections were needed, makes the model more appealing. Indeed, in addition to administer warfarin in the drinking water, only 3 weekly injections of vitamin K are needed, thus limiting the discomfort of the animals and the time spent on the treatment itself. Furthermore, with the proposed regimen, including one week of pre-treatment with vitamin K, the mortality rate secondary to bleeding was around 5%, in contrast to the 17% mortality reported for the VDN model ²⁷.

Thus, at least two experimental models of calcification-induced ISH are now available and could provide complementary observations, considering that the mechanism of human calcification is currently unknown. In that respect, MGP was shown to be decreased in human vascular calcified lesions of intimal or medial localization ¹⁹. Furthermore, it was reported that MGP co-localizes with elastic fibers and that this co-localization is lost in calcified lesions, with high amounts of the peptide at the border between normal and calcified areas ²⁰. Thus, it is likely that a lack of mature MGP could be involved in human calcification ²⁰, and the model presented here, by blocking the maturation of MGP, could be pathophysiologically related to human vascular calcification, making it an attractive model to study ISH experimentally.

2.5.1. Relationship between calcification, arterial stiffening and ISH

Using the VDN model, the group of Atkinson has elegantly shown the relationship between vascular calcification and the development of ISH. The mechanism likely involves an increased rigidity of the arterial wall, which is thought to contribute to the elevation of

PP^{5,8}. Indeed, in the VDN model, several indices of aortic rigidity are elevated²³. In the current study we provide further evidence that PP increases in association with aortic calcification. Indeed, the correlation coefficient between aortic calcium content and pulse pressure suggest that 50% ($r^2=0.51$) of changes in PP can be accounted for by changes in aortic calcium content. It is likely that the elevation of PP was due to a more rigid arterial wall, as confirmed by the significant elevation of PWV measured at 4 weeks. A relationship between arterial calcification and stiffening has also been suggested in patients with ESRD²⁴. Moreover, there is a positive correlation between age and stiffening of aorta among human with ISH²⁵. It is thus believed that aging and some pathologies (ESRD and diabetes mellitus) contribute to the development of ISH by allowing a gradual deposition of calcium on aortic elastic lamellae²⁶. Chronic WK treatment thus represents a good experimental model to study these relationships, especially in conjunction with antihypertensive therapies in an effort to understand the mechanisms by which they improve large artery compliance. Such studies are currently under way.

In addition to calcification, the ECM was also modified in WK-treated rats. Indeed, staining of elastin fibers decreased while collagen tended to increase, especially at 8 weeks. These changes lead to a significant elevation of C/E ratio, another factor that could contribute to decrease arterial compliance²⁷⁻²⁹. However, it is possible that the results were influenced by the effect of calcification on the histological staining and this limitation will require complementary approaches to confirm our findings. Interestingly, similar findings were reported in the VDN model, using alternative methods³⁰.

2.5.2. Impact of experimental ISH on the cardiovascular system

In this model of experimental ISH, the global structure of aorta was not affected, suggesting that PP does not trigger large artery hypertrophy or remodeling. Our findings could be explained by the Laplace law [Wall stress = $(\text{MAP} \times \text{ID}) / (2 \times \text{media})$], as it appears to modulate vascular remodeling. Indeed, since MAP was not modified, remodeling is not expected, unless pulse pressure has a direct impact on remodeling. In human ISH, increases of the M/L ratio and the CSA were reported, but mainly due to intimal proliferation and atherosclerosis²⁹. The discrepancy could be explained by the fact that the rat rarely develops neointimal hyperplasia without previous injury. It is also possible that the rapid calcification, which is responsible for the PP elevation, impedes on the capacity of the vessel to remodel.

Rats treated with WK for 4 and 8 weeks did not develop LVH and LV area and wall thickness were not modified, arguing against a role of SBP on cardiac remodeling. In contrast, however, a relationship between aortic stiffness and cardiac hypertrophy was reported in the VDN model³¹, but such a relationship may take up to 3 months to develop³², suggesting that 8 weeks may not be sufficient to observe the impact of PP elevation on cardiac remodeling. It must be pointed out, however, that hearts show signs of calcification and bradycardia in the VDN model^{11,31}, which may stimulate hypertrophy to maintain a normal function³². In support for a role of PP to induce cardiac hypertrophy, the study of normotensive individuals, systolo-diastolic hypertensives (SDH) and ISH patients reported

an enhanced left ventricular mass index in SDH and ISH ³³. However, it is not clear if the patients with ISH previously had SDH with LVH. Indeed, DBP decreases with time (mean patient age was 67) and once LVH is present, it is generally irreversible without treatment ³⁴. In spontaneously hypertensive rats, central PP increases significantly (reducing the PP amplification that occurs from central to peripheral arteries), and this has been suggested to contribute to enhance cardiac afterload and promote hypertrophy ³⁵. In the WK model, the PP amplification was maintained (PP increased from 26 to 37 mmHg from the carotid to the abdominal aorta in control rats and from 44 to 59 mmHg in WK rats), which could help to minimize the hemodynamic impact on the heart.

Vasoconstriction and aortic endothelial-dependent relaxations were also evaluated, as these functions can have an impact on vascular compliance ^{36,37}. We could not detect any major vasoreactivity changes in aortic rings from WK-treated rats as compared to controls. These results indicate that the enhanced aortic stiffness, as measured by PWV, is unlikely to result from modified reactivity of the vessel wall itself. However, it is conceivable that changes in receptor number or agonist concentrations could contribute to enhance the stiffness. To evaluate the impact of an elevation of pulse pressure on global sympathetic and renin-angiotensin system activity, we measured plasma catecholamine levels and renin activity. These global indices were not elevated. In fact, plasma rennin activity was even significantly reduced, arguing against a role of enhanced reactivity in the increased stiffness. From a different point of view, these results also suggest that chronic elevation of

pulse pressure alone does not lead to endothelial dysfunction, in contrast to what is observed in most models of essential hypertension³⁸ and in aging rats³⁹.

2.6. Conclusion

In conclusion, we present a new model of ISH, which is obtained rapidly and reproducibly, by allowing aortic calcification in controlled conditions. This model reproduces some of the hallmarks of ISH by a mechanism, MGP inhibition, which could be clinically relevant. The moderate but sustained elevation of PP during 8 weeks does not lead to global cardiovascular remodeling or to endothelial dysfunction. We believe that this model of ISH can be a good pre-clinical tool to study the mechanism of action of current antihypertensive drugs and to devise new therapies specifically for this important pathological condition.

2.7. Acknowledgements

The authors acknowledge the skilled technical assistance of Louise Ida Grondin and Sanaë Yamaguchi, and are thankful to Dr Daniel Lamontagne for access to his aortic organ bath setups.

2.8. References

1. Darne B, Girerd X, Safar M, Cambien F, Guize L: Pulsatile versus steady component of blood pressure: a cross-sectional analysis and a prospective analysis on cardiovascular mortality. *Hypertension* 1989;13:392-400.

2. Franklin SS: Is there a preferred antihypertensive therapy for isolated systolic hypertension and reduced arterial compliance? *Curr Hypertens Rep* 2000;2:253-9.
3. O'Rourke MF: Isolated systolic hypertension, pulse pressure, and arterial stiffness as risk factors for cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 1999;1:204-11.
4. Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L: Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension* 1998;32:560-4.
5. Safar ME: Hypothesis on isolated systolic hypertension in the elderly. *J Hum Hypertens* 1999;13:813-5.
6. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB: Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000;342:1478-83.
7. Edmonds ME: Medial arterial calcification and diabetes mellitus. *Z Kardiol* 2000;89:101-4.
8. Ibels LS, Alfrey AC, Huffer WE, Craswell PW, Anderson JT, Weil R, 3rd: Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am J Med* 1979;66:790-6.
9. Cantini C, Kieffer P, Corman B, Liminana P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I: Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats. *Hypertension* 2001;38:943-8.

10. Henrion D, Chillon JM, Godeau G, Muller F, Capdeville-Atkinson C, Hoffman M, Atkinson J: The consequences of aortic calcium overload following vitamin D₃ plus nicotine treatment in young rats. *Journal of Hypertension* 1991;9:919-926.
11. Thorin E, Henrion D, Oster L, Thorin-Trescases N, Capdeville C, Martin JA, Chillon JM, Hicks PE, Atkinson J: Vascular calcium overload produced by administration of vitamin D₃ and nicotine in rats. Changes in tissue calcium levels, blood pressure, and pressor responses to electrical stimulation or norepinephrine in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;16:257-66.
12. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J: Aortic calcification produced by vitamin D₃ plus nicotine. *J Vasc Res* 1997;34:386-98.
13. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC: Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev* 2001;21:274-301.
14. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
15. Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL: The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998;8:357-75.
16. Otawara Y, Price PA: Developmental appearance of matrix GLA protein during calcification in the rat. *J Biol Chem* 1986;261:10828-32.

17. Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG: Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986;25:1176-80.
18. Price PA, Faus SA, Williamson MK: Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1400-7.
19. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL: Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 2:63-8.
20. Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Cleutjens JP, Thijssen HH, De Mey JG, Vermeer C: Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:485-90.
21. McDonald DA: Regional pulse-wave velocity in the arterial tree. *J Appl Physiol* 1968;24:73-8.
22. Dao HH, Lemay J, de Champlain J, deBlois D, Moreau P: Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* 2001;19:1965-73.
23. Marque V, Van Essen H, Struijker-Boudier HA, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I: Determination of aortic elastic modulus by pulse wave velocity and wall tracking in a rat model of aortic stiffness. *J Vasc Res* 2001;38:546-50.

24. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F: Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2000;15:1014-1021.
25. Gillessen T, Gillessen F, Sieberth H, Hanrath P, Heintz B: Age-related changes in the elastic properties of the aortic tree in normotensive patients: investigation by intravascular ultrasound. *Eur J Med Res* 1995;1:144-8.
26. Davies MR, Hruska KA: Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2001;60:472-9.
27. Lakatta EG: Mechanisms of hypertension in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 1989;37:780-90.
28. Messerli FH, Ventura H, Aristimuno GG, Suarez DH, Dreslinski GR, Frohlich ED: Arterial compliance in systolic hypertension. *Clin Exp Hypertens A* 1982;4:1037-44.
29. Kocemba J, Kawecka-Jaszcz K, Gryglewska B, Grodzicki T: Isolated systolic hypertension: pathophysiology, consequences and therapeutic benefits. *J Hum Hypertens* 1998;12:621-6.
30. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J: Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension* 1997;29:999-1006.
31. Tatchum-Talom R, Niederhoffer N, Amin F, Makki T, Tankosic P, Atkinson J: Aortic stiffness and left ventricular mass in a rat model of isolated systolic hypertension. *Hypertension* 1995;26:963-70.

32. Lartaud-Idjouadiene I, Lompre AM, Kieffer P, Colas T, Atkinson J: Cardiac consequences of prolonged exposure to an isolated increase in aortic stiffness. *Hypertension* 1999;34:63-9.
33. Grassi G, Seravalle G, Bertinieri G, Turri C, Dell'Oro R, Stella ML, Mancia G: Sympathetic and reflex alterations in systo-diastolic and systolic hypertension of the elderly. *J Hypertens* 2000;18:587-93.
34. Verdecchia P, Carini G, Circo A, Dovellini E, Giovannini E, Lombardo M, Solinas P, Gorini M, Maggioni AP: Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1829-35.
35. Tsoucaris-Kupfer D, Benetos A, Legrand M, Safar ME: Pulse pressure gradient along the aortic tree in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats: effect of nicardipine. *J Hypertens* 1993;11:135-9.
36. Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR: Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation* 2002;105:213-7.
37. Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME: Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats. *Hypertension* 2001;37:313-21.
38. Moreau P, Nava E, Takase H, Lüscher TF: Local regulation of vascular function: focus on endothelium-dependent mechanisms in normotension, hypertension and atherosclerosis, In Zanchetti A, Mancia G (eds): *Pathophysiology of hypertension*. Amsterdam, Elsevier, 1997, pp 975-1006. (Birkenhäger WH, Reid JL, ed. *Handbook of hypertension*; vol 17).

39. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Lüscher TF: Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *Journal of Clinical Investigation* 1996;98:899-905.

Table 1. Effect of Warfarin / Vitamin K₁ treatment on hemodynamics parameters, cardiac remodeling and organ calcium content.

Parameters	Ctl4	WK4	Ctl8	WK8
<i>Hemodynamics and weight</i>				
HR, beats•min ⁻¹	380 ± 8	386 ± 12	344 ± 10	331 ± 12
Carotid SBP (mmHg)	136.4 ± 4.4	148.2 ± 9.4	ND	ND
Carotid DBP (mmHg)	110.4 ± 3.0	104 ± 7.9	ND	ND
Carotid PP (mmHg)	26.0 ± 2.3	44.2 ± 3.9*	ND	ND
BW, g	369.6 ± 6.5	336.7 ± 9.9*	479.8 ± 14.4	455.5 ± 9.8
BW gain by week, g	36.7 ± 1.2	33.5 ± 2.3	33.0 ± 1.5	30.5 ± 1.1
HW, g	1.02 ± 0.02	0.96 ± 0.01	1.16 ± 0.05	1.13 ± 0.04
HW/BW, %	0.28 ± 0.04	0.29 ± 0.08	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.07
LVW, g	0.43 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.47 ± 0.02
LVW/BW, %	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.08	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.05
LV Area/BW, x 10 ⁻² mm ² •g ⁻¹	13.0 ± 0.7	12.1 ± 0.5	ND	ND
LV thickness/BW, x 10 ⁻² mm•g ⁻¹	1.40 ± 0.10	1.40 ± 0.04	ND	ND
<i>Calcium content</i>				
LV calcium, µg•mg ⁻¹	0.78 ± 0.05	0.77 ± 0.04	0.75 ± 0.01	0.75 ± 0.01
Kidney calcium, µg•mg ⁻¹	0.79 ± 0.1	1.14 ± 0.29	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.02
MES calcium, µg•mg ⁻¹	0.57 ± 0.05	0.52 ± 0.07	ND	ND

Ctl4 and Ctl8 : Control at 4 and 8 weeks; WK4 and WK8: 4 and 8 weeks of warfarin/vitamin K treatment; HR : Heart rate; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure; BW : Body weight; HW : Heart weight; LVW : Left ventricular weight; MES : Mesenteric arterial bed; ND: not determined. *P<0.05 vs age-matched controls.

Table 2. Effect of Warfarin / Vitamin K₁ treatment on aortic remodeling and extra-cellular matrix composition.

Parameters	Ctl4	WK4	Ctl8	WK8
ID, mm	1.57 ± 0.02	1.44 ± 0.06	1.58 ± 0.05	1.66 ± 0.05
ED, mm	1.76 ± 0.02	1.65 ± 0.06	1.78 ± 0.05	1.85 ± 0.05
Media, µm	94 ± 2	101 ± 6	96 ± 4	94 ± 2
M/L, %	12.1 ± 0.3	14.3 ± 1.4	12.2 ± 0.8	11.3 ± 0.4
CSAm, mm ²	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.52 ± 0.02
Number of cells by mm	225 ± 17	276 ± 13	245 ± 15	258 ± 44
Collagen area, x 10 ⁻² mm ²	8.3 ± 0.3	8.1 ± 0.4	9.1 ± 0.3	10.6 ± 0.6
Elastin area, x 10 ⁻² mm ²	20.7 ± 0.8	17.7 ± 0.7	17.8 ± 1.3	16.0 ± 1.0

Ctl4 and Ctl8 : Control at 4 and 8 weeks; WK4 and WK8: 4 and 8 weeks of warfarin/vitamin K treatment; ID : Internal Diameter; ED : External Diameter; M/L : Media to Lumen ratio; CSAm : medial Cross Sectional Area. Additional data are presented in figure 3.

Table 3. Characteristics of the aortic concentration-response curves to vasoconstrictors and vasodilators.

Parameters		Ctl8	WK8
KCl	Maximum (g)	1.60 ± 0.13	$1.05 \pm 0.20^*$
NE	Maximum (%)	141.5 ± 10.2	122.8 ± 13.9
	EC ₅₀	8.00 ± 0.18	7.92 ± 0.17
ET-1	Maximum (%)	174.4 ± 24.9	167.5 ± 25.2
	EC ₅₀	7.83 ± 0.09	7.80 ± 0.12
ACh	Maximum (%)	74.7 ± 9.6	80.4 ± 5.3
	EC ₅₀	7.03 ± 0.31	7.13 ± 0.21
SNP	Maximum (%)	106.6 ± 5.1	106.9 ± 4.5
	EC ₅₀	8.00 ± 0.12	7.92 ± 0.2

Ctl8 : Control at 8 weeks; WK8: 8 weeks of WK treatment; NE: norepinephrine; ET-1: endothelin-1; ACh: acetylcholine; SNP: sodium nitroprusside; EC50: concentration that produces 50% of the maximal response. See methods for calculation of % for contraction and relaxation.

2.9. Figure legends

Figure 1. (A) Systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), (B) mean arterial pressure (MAP), (C) pulse wave velocity (PWV), (D) aortic calcium content and (E) carotid calcium content in rats treated for 4 and 8 weeks with Warfarin and Vitamin K₁ (solid bars and symbols) or age-matched controls (open bars and symbols). (F) Linear regression between aortic calcium content and pulse pressure (PP). WK4: 4 weeks of Warfarin / Vitamin K₁ treatment; Ctl4: age-matched control rats. Statistical comparisons were performed by a t-test. *P<0.05 vs age-matched control group.

Figure 2. Light microscopy of aortic sections from (A) control and (B) Warfarin / Vitamin K₁ rats treated for 8 weeks. The von Kossa staining was not counter-stained to facilitate the observation L : Lumen.

Figure 3. Effects of Warfarin / Vitamin K₁ on (A) collagen and (B) elastin proportion in the aortic media, and (C) on the collagen to elastin ratio (C/E) after 4 and 8 weeks of treatment. Open bars represent age-matched controls and solid bars represent rats treated with Warfarin / Vitamin K₁. *P<0.05 vs control rats age-matched group (t-test).

Figure 1

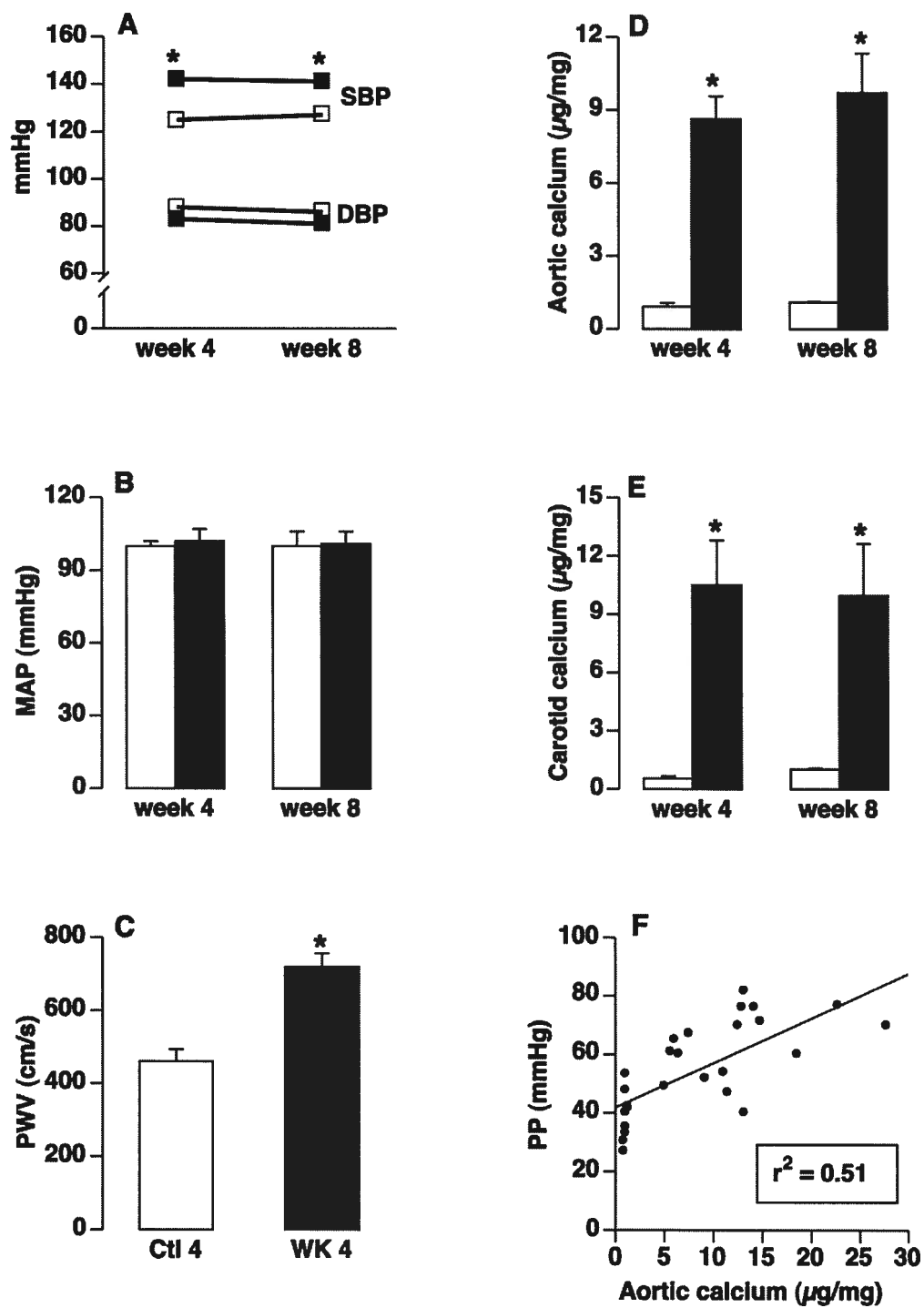


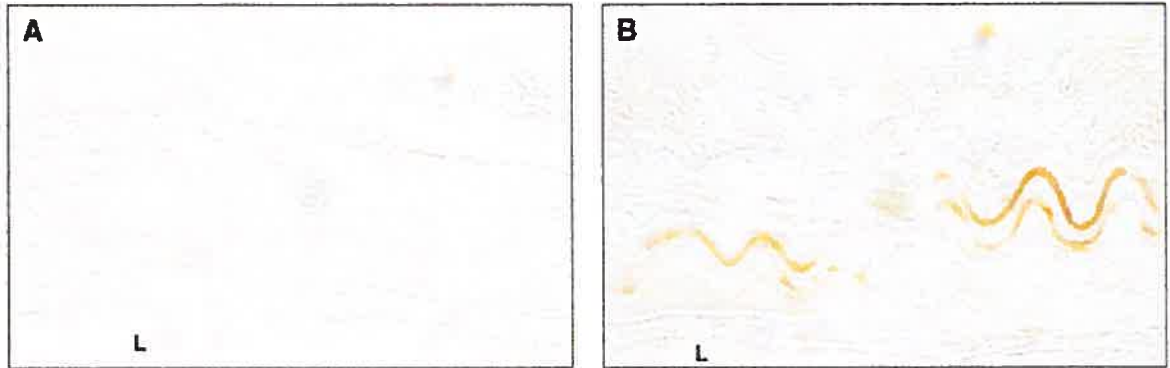
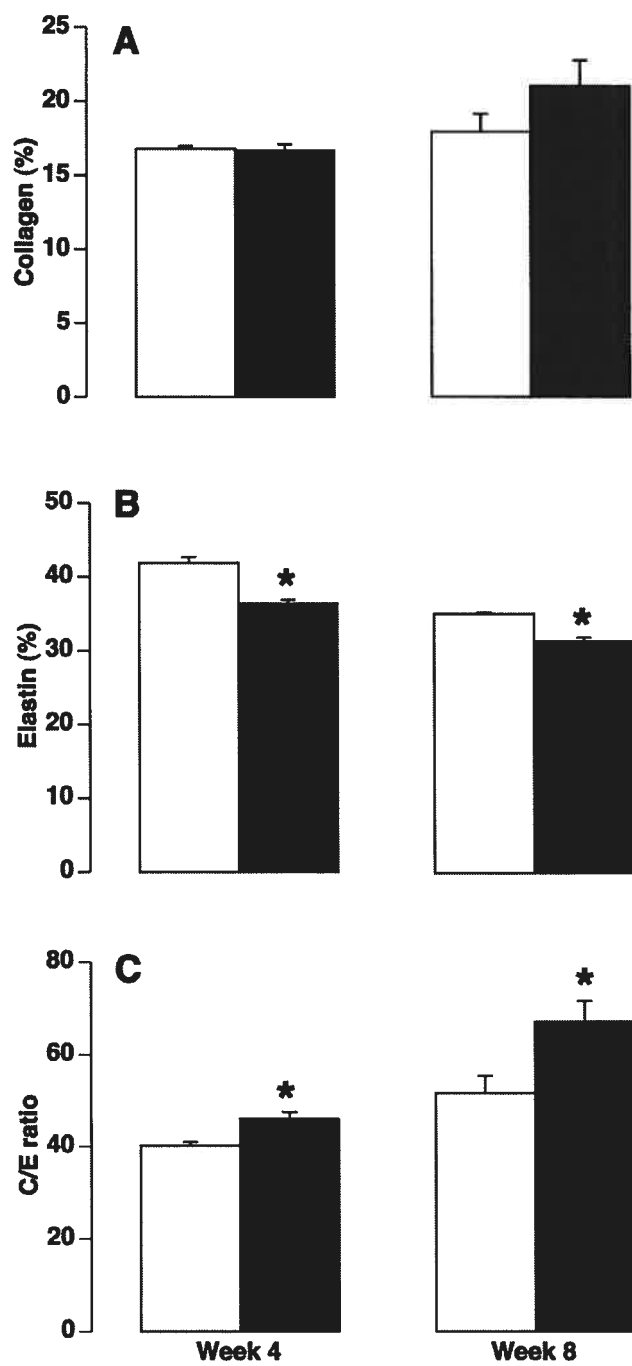
Figure 2

Figure 3

Chapitre 3. Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: A Role for Endothelin?

Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2004;44(Suppl. 1) :S147-S150

Rachida Essalihi* M.Sc., Vincent Ouellette* B.Pharm., Huy Hao Dao* M.Sc., Marc D. McKee[†] Ph.D. and Pierre Moreau* Ph.D.

*Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

[†]Dept. of Anatomy and Cell Biology, and Faculty of Dentistry, McGill University, Montréal, Québec, Canada


Short Title : Essalihi et al. Phenotypic changes and vascular calcification

Sources of Support :

RE and HHD receive a stipend from the Rx&D-HRF/CIHR and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), respectively. PM is a scholar of the Canadian Institutes for Health Research, and MDM is a scholar of the FRSQ. Funding was provided by grants from the Canadian Institutes for Health Research to PM and MDM.

Address for correspondence :

Pierre Moreau, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of Pharmacy
Université de Montréal
2900 Édouard-Montpetit, Room R-313
P.O. Box 6128, Stn « Centre-Ville »
Montréal, Québec
H3C 3J7 Canada

Phone : (514) 343-6111 x3342
Fax : (514) 343-2102
e-mail : 

3.1. Abstract

We have previously shown that an endothelin receptor antagonist (ETRA) can regress medial arterial calcification (MAC) in a rat model. The goal of this study was to characterize the phenotypic changes of vascular smooth muscle cells (VSMCs) during calcification and mineral loss, to better understand underlying mechanisms. Control (Ctl) Wistar rats were compared to rats treated only with warfarin / vitamin K1 (15 mg/kg/day, WVK) during 8 weeks, or in combination with darusentan (30 mg/kg/day, WVK+DAR) for the last 4 weeks. VSMC, bone cell and macrophage phenotypes were evaluated by the local expression of α -actin, TRAP and ED-1, respectively. Proteins involved in the modulation of bone resorption like osteopontin (OPN) and osteoprotegerin (OPG) were also evaluated by immunohistochemistry. The WVK treatment increased MAC by 9-fold ($P<0.05$). At sites of calcification, there was a decrease in α -actin localization, and an appearance of OPN immunostaining. Histochemical and immunostaining for osteoclast and macrophage markers, as well as for OPG, were negative. Although the extent of calcification foci was reduced by darusentan, protein localization in the calcified areas was not modified. Thus, the development of MAC produces a phenotypic change of VSMCs that does not appear to be normalized in regions remaining calcified during mineral loss.

Key words – Medial arterial calcification, endothelin, VSMC, osteopontin.

3.2. Introduction

Matrix Gla protein (MGP), an endogenous inhibitor of vascular calcification, requires vitamin K-dependent maturation to be active. Warfarin, by inhibiting the recycling of vitamin K, promotes the development of medial arterial calcification (MAC) in rats [1]. Medial arterial calcification is a ubiquitous phenomenon observed with aging, diabetes and end-stage renal disease, and contributes to large artery stiffening in those conditions (for review see Benetos et al. [2]). Arterial calcification is an active process potentially orchestrated by phenotypically modified vascular smooth muscle cells (VSMCs). In Mönckeberg's Sclerosis (medial calcification), VSMCs exhibited osteoblastic and chondrocytic properties in vitro [3]. As for bone resorption, numerous proteins have been implicated in the modulation of vascular calcification, such as the noncollagenous matrix proteins osteopontin (OPN) and osteoprotegerin (OPG).

Our group has previously shown that an endothelin receptor antagonist (ETRA) can regress MAC in a rat model produced by chronic warfarin treatment [4]. The objective of this study was to examine phenotypic changes of VSMCs associated with calcified foci during MAC development, as well as during ETRA-induced mineral loss, to gain insight on potential mechanisms.

3.3. Methods

3.3.1. Animal and experimental protocol

Control (Ctl) Wistar males rats (175-200 g, Charles-River Canada, St-Constant, Québec, Canada) were compared to rats receiving warfarin (15 mg/kg/day in the drinking water, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and vitamin K1 (phyloquinone, 15 mg/kg/day, s.c., Sigma) (WVK) for 8 weeks. During the last four weeks of treatment, half of the WVK group also received darusentan (WVK+DAR, 30 mg/kg/day mixed in chow, Knoll AG, Germany). Darusentan is an ETRA with a hundred-fold selectivity for ET_A-versus ET_B-receptors.

The determination of calcium content in the aorta was performed with a calcium kit from Sigma as previously described [5].

3.3.2. Immunohistochemistry, histochemistry and conventional histology

Experimental and control rats were sacrificed by decapitation, and a 5 mm-long segment of each thoracic aorta was harvested and immediately fixed in phosphate-buffered paraformaldehyde 4%, with subsequent embedding in paraffin. Sections (7 µm thickness) were cut and mounted on glass slides and deparaffinized with xylene, followed by hydration in graded concentrations of ethanol (from 100% to 50%). Each slide-mounted tissue section was incubated overnight at room temperature with primary antibody against smooth muscle α -actin (Clone 1A4 from Neomarkers, Fremont, CA, USA) for VSMC

detection, ED-1 (Neomarkers) for macrophage detection, LF-123 (courtesy of Dr. Larry W. Fisher, National Institutes of Health, MD, USA) for OPN detection and N-20 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, USA) for OPG detection. Antibodies were used at a dilution of 1:200 (α -actin, ED-1 and LF-123) or 1:100 (N-20) in 0.2% bovine serum albumin TTBS containing 0.5% of appropriate normal serum (goat or rabbit). Digestion with pronase (0.5 mg/ml, Boehringer Mannheim, Germany) was additionally performed before incubation with ED-1 primary antibody, whereas this step was omitted for other antibody incubations. After washing, primary antibodies were detected with appropriate secondary antibodies conjugated to biotin. Biotin was detected using a Vectastain ABC-AP Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), and color development was achieved with Fast Red TR/Naphthol AS-MX phosphate alkaline phosphatase substrate (Sigma) with 1 mM added levamisole (Sigma). The sections were counterstained with warm (57°C) filtered methyl green (Vector Laboratories) for 5 minutes. Coverslips were mounted onto the glass slides using Kaiser's glycerol jelly mounting medium. Spleen and bone from an untreated rat were used as positive controls for ED-1 (macrophages) and TRAP (osteoclasts, see below), respectively. Sections were stained with hematoxylin and eosin for routine morphology.

For histochemical staining of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) to identify osteoclasts, de-waxed sections were pre-incubated for 20 minutes in a 50 mM sodium acetate and 40 mM potassium sodium tartrate buffer (pH 5.0). Then sections were incubated for 15 minutes at room temperature in the above buffer containing naphthol AS-

MX phosphate (2.5 mg/ml) dissolved in dimethylformamide (Sigma) as substrate, and fast garnet GBC (0.5 mg/ml, Sigma) as a stain for the reaction product. After washing with distilled water, the sections were counterstained with methyl green nuclear counterstain (Vector Laboratories) and mounted under coverslips with Kaiser's glycerol jelly.

3.4. Results

The treatment of rats with warfarin and vitamin K (WVK) caused an increase in aortic calcium content by a factor of 9-fold, and treatment with darusentan significantly regressed this vascular calcification (Ctl: 1.136 ± 0.043 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry aorta. WVK: 10.392 ± 1.855 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry aorta. WVK+DAR: 3.567 ± 0.0864 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry aorta), confirming previous results [4]. We have previously shown, by von Kossa staining, that areas of MAC are most prominent on elastic lamellae adjacent to the adventitia where they have an undulated appearance (inset in Figure 1A) [5]. Such an association between calcification and an undulating profile was confirmed in the present study (not shown). At the sites of calcification, there was a marked decrease in α -actin localization (Figure 1A), while H&E staining revealed abundant cells in these areas (Figures 1C, 1D). Strong immunohistochemical staining for OPN was localized to the calcified areas (Figure 2A), as demonstrated in serial sections stained for mineral using the von Kossa method (data not shown). In contrast, osteoclast and macrophage markers (Figures 1E and 1G, respectively), as well as OPG expression (Figure 2C), were negative in aortic sections at these calcified

regions. Although darusentan reduced the final extent of calcification, in areas remaining calcified after the treatment, the staining patterns were not different from the WVK conditions (Figures 1B, 2B, 2D, data not shown for TRAP and ED-1).

3.5. Discussion

Our findings in a rat model of MAC suggest that VSMCs change their phenotype in the presence of mineral deposits in the blood vessel wall. While cell numbers remained high in these areas as evidenced by routine morphological staining with hematoxylin and eosin (Figure 1C), α -actin immunostaining was reduced (Figure 1B compared to Figure 1A). Interestingly, Ahmed et al. (2001) have shown a similar decrease in actin expression in dialysis patients with calcific uremic arteriolopathy[6]. In knockout mice that lack MGP, cartilage-producing chondrocytes can be detected in affected calcified arteries [7]. In contrast, no histological evidence for the presence of chondrocytes, nor any staining metachromasia characteristic of cartilage matrix, was observed in any of our affected calcified arteries. One explanation for this difference may be the reduced levels of arterial calcification present after our WVK and darusentan treatment relative to that observed in the MGP-knockout mice in which the calcification is so pervasive that the mice die at approximately one month from aortic dissection [7]. The absence of macrophages (ED-1 detection by immunohistochemistry, Figure 1G) in our model of MAC correlates well with the literature, where unlike intimal calcification, medial calcification occurs in the absence

of lipid or inflammatory cells [8]. In addition, the absence of macrophages during ETRA administration indicate that the mineral loss induced by the antagonist is not mediated by the local recruitment of monocytes/macrophages which may ultimately fuse to form mineral-resorbing osteoclasts typical of bone resorption [9].

Although OPN is not expressed in normal blood vessels, abundant evidence exists for its upregulated expression in the vessel wall, and its accumulation, at sites of calcification in the arteries. This is true not only for human uremic arteriolopathy [6], but also for arteries of patients with end stage renal disease [10] and with diabetes [11]. Likewise, in the present study, there was an increased localization of OPN in the calcified areas of WVK-treated aortas. Both in vitro and in vivo studies suggest that OPN not only inhibits mineral accretion and crystal growth by direct binding to crystal surfaces, but that it also actively promotes mineral dissolution by favoring acidification of the extracellular matrix [12]. Despite this, we could not detect significant differences between the WVK and WVK+DAR groups in terms of local OPN accumulation (quantification and non-parametric statistics on 6 slides of each group did not reveal any difference) that might explain the loss of mineral. One possibility for changes in the mineral-inhibiting potency of OPN would be that darusentan treatment affects the phosphorylation state of OPN, a post-translational modification that has been shown to influence its inhibitory activity [13]. This possibility will be explored further in future studies.

In summary, our immunohistological studies show that the induction of MAC, as a consequence of the effects of undercarboxylation of MGP after administration of warfarin to rats, produces a phenotypic change in VSMCs. However, subsequent mineral loss mediated by an endothelin receptor antagonist was not associated with overt changes in mineral-regulating proteins such as OPN, nor was it accompanied by a recruitment of mineral-resorbing osteoclasts. We are currently expanding this work to include gene-profiling strategies to detect changes in the arterial wall after mineralization in our experimental model of medial arterial calcification.

3.6. Acknowledgments

We acknowledge the skilled technical assistance of Isabelle Turgeon and Louise Ida Grondin, and are thankful for the support of Knoll AG, the Canadian Institutes for Health Research, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and Rx&D.

3.7. References

1. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1400-7.
2. Benetos A, Waeber B, Izzo J, et al. Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. *Am J Hypertens* 2002;15:1101-8.
3. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, et al. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100:2168-76.
4. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, et al. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2002;20:1597-606.
5. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, et al. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* 2003;16:103-10.
6. Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, et al. Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis* 2001;37:1267-76.
7. Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.

8. Proudfoot D, Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* 2001;26:245-51.
9. Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 2003;21:337-43.
10. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002;61:638-47.
11. Takemoto M, Yokote K, Nishimura M, et al. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:624-8.
12. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002;161:2035-46.
13. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000;275:20197-203.

3.8. Figure Legends

Figure 1. Immunolocalization of α -actin, TRAP and ED-1 in WVK (A, C, E, G) and WVK+DAR-treated (B, D) rats. Thoracic aortae were fixed in aldehyde, embedded in paraffin, and analyzed immunohistochemically for α -actin (A, B), and ED-1 (G), or histochemically for TRAP (E). Other sections were stained with H&E to visualize arterial histology (C, D) and with von Kossa to reveal calcium (inset in panel A). Bone and spleen from untreated rat were used as positive controls for TRAP (F) and ED-1 (H), respectively. Boxes illustrate the undulations of the aorta, typical of calcified areas (A and B). L, lumen.

Figure 2. Immunolocalization of OPN and OPG in WVK (A, C) and WVK+DAR-treated (B, D) rats. Thoracic aortae were fixed in aldehyde, embedded in paraffin, and analyzed immunohistochemically for OPN (A, B) or OPG (C, D) localization. Bone from an untreated rat was used as a positive control for OPG (E). L, lumen.

Figure 1 Essalilhi et al

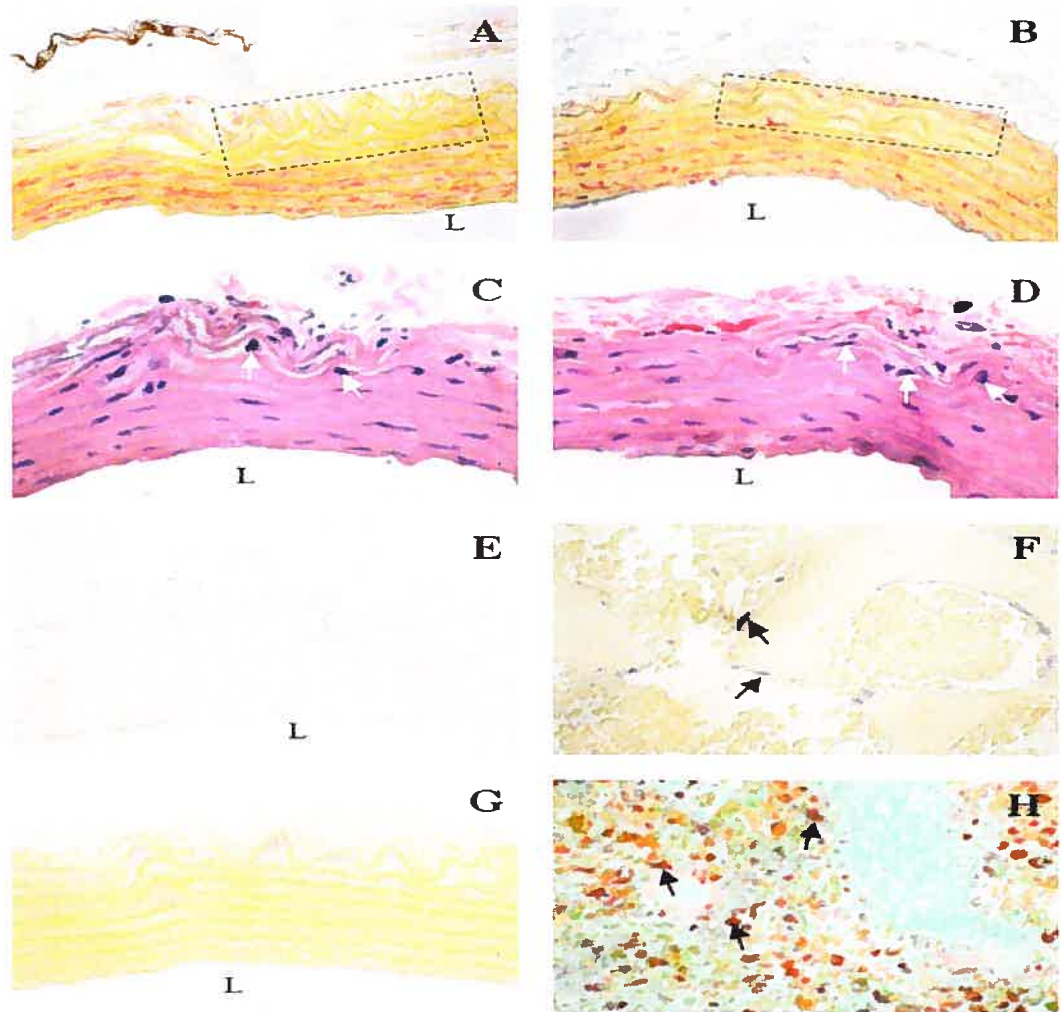
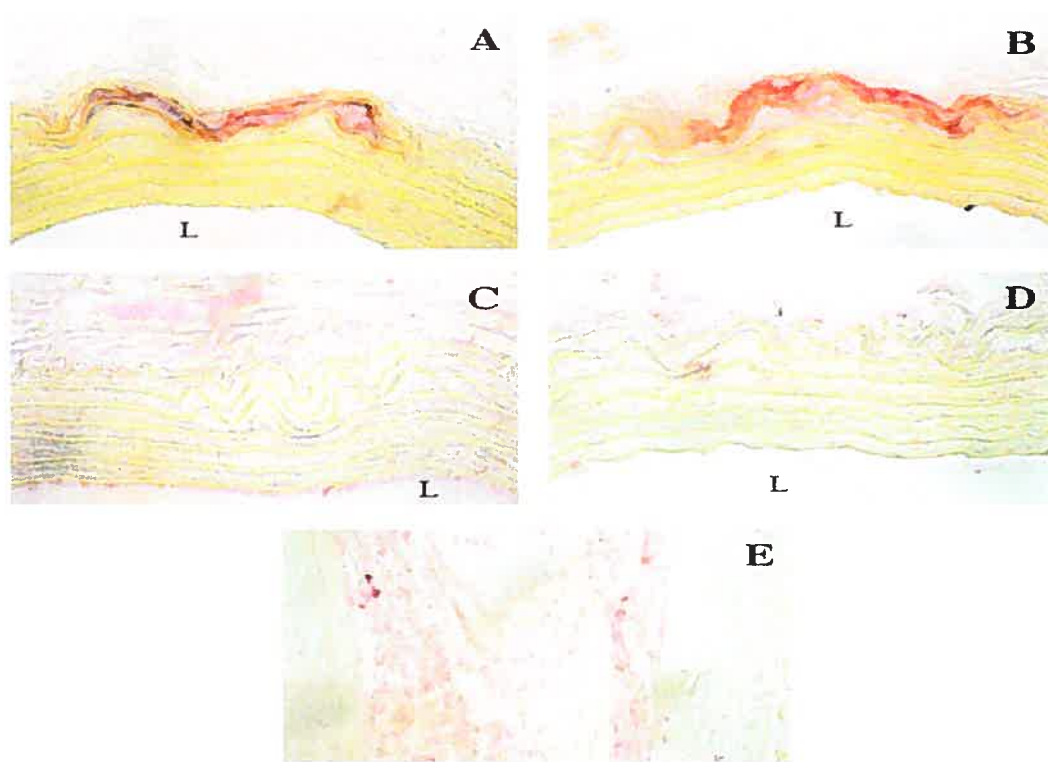


Figure 2 Essalihi et al.



Chapitre 4. Regression of Medial Elastocalcinosis in the Rat Aorta: A New Function for Carbonic Anhydrase

Circulation, 2005;112:1628-1635

***Rachida Essalihi M.Sc., *Huy Hao Dao Ph.D., *Liz-Ann Gilbert M.Sc., *Céline Bouvet M.Sc., *Yves Semerjian B.Pharm., †Marc D. McKee Ph.D. and *Pierre Moreau Ph.D.**

***Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada**

†Dept. of Anatomy and Cell Biology, and Faculty of Dentistry, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Short Title : Essalihi et al. Vascular elastocalcinosis and carbonic anhydrase

Address for correspondence :

Pierre Moreau, Ph.D.
Associate Professor, Faculty of Pharmacy
Université de Montréal
2900 Édouard-Montpetit
Pavillon Jean-Coutu, room 3197
P.O. Box 6128, Stn « Centre-Ville »
Montréal, Québec
H3C 3J7 Canada

Phone : (514) 343-6111 x3342

Fax : (514) 343-7073

e-mail : 

4.1. Abstract

Background: Determine if carbonic anhydrase (CA), which plays an important role in bone resorption, contributes to vascular mineral loss induced by an endothelin receptor antagonist.

Methods and Results: Wistar rats were compared to rats receiving warfarin and vitamin K₁ (WVK) for 8 weeks alone or in association with the endothelin receptor antagonist darusentan (30 mg/kg/day), the CA inhibitor acetazolamide (100 mg/kg/day) or both for the last 4 weeks. Rats were also treated with WVK for 5 or 6 weeks and darusentan was added for the last or last two weeks of treatment, respectively. Treatment with WVK produced medial elastocalcinosis in the aorta and carotid arteries. Immunohistochemistry revealed that CAII was already abundant in the adventitia and in calcified areas of aortic sections from WVK-treated rats. Darusentan did not significantly modify its abundance or distribution. In contrast, CAIV immunostaining, which was weak in WVK-treated rats, became apparent after one week of darusentan treatment and declined towards basal levels thereafter. These findings were confirmed by a parallel increase in CAIV protein abundance and activity in the aorta. The mineral loss induced by darusentan was blunted by acetazolamide treatment, confirming the functional relevance of the biochemical findings. Moreover, CAIV immunostaining was enhanced much later in the carotids, where darusentan did not regress elastocalcinosis.

Conclusion: Vascular mineral loss induced by the blockade of endothelin receptors seems dependent on the activation of membrane-bound CAIV, suggesting that mineral loss may proceed via local changes in pH similar to that seen in bone resorption.

Key words – vascular calcification, carbonic anhydrase, endothelin, aging.

4.2. Introduction

Arterial medial elastocalcinosis (MEC, or medial arterial calcification) is characterized by the deposition of calcium-phosphate mineral within elastic lamellae of arteries. This ubiquitous process generally appears after 50 years of age,¹ but is accelerated by hypertension,² diabetes³ and end-stage renal disease.⁴ Vascular MEC contributes to the increase in rigidity of large arteries observed with aging and thus to the general process of arteriosclerosis. Arterial stiffening leads to an elevation of systolic and pulse pressures (PP) and contributes to the development of isolated systolic hypertension (ISH), the predominant type of hypertension found in the elderly population.^{5,6} Epidemiological studies have shown systolic blood pressure (SBP) and PP to be strong predictors of cardiovascular events, especially in patients over 55 years of age.⁷ Although the control of diastolic blood pressure (DBP) can be obtained in large populations, the control of SBP and PP is achieved to a much lesser extent.⁸ We postulate that drugs devised to reduce MEC could be of therapeutic value by reducing arterial stiffness.

The pathological process of MEC is still poorly understood and until recently, elastocalcinosis was considered to be a passive process that occurred with time and was associated with damaged elastic fibers. However, substantial new evidence now shows that vascular calcification is an active phenomenon, which is controlled by the expression of growth factors, matrix proteins and bone-related proteins.⁹⁻¹¹ As an example, mice that lack matrix Gla protein (MGP), a noncollagenous matrix protein secreted by vascular smooth

muscle cells, develop to term, but die within 2 months as a result of massive elastocalcinosis which leads to aortic rupture,¹² indicating that MGP is an important endogenous inhibitor of vascular calcification. Interestingly, warfarin inhibits the vitamin K-dependent gamma carboxylation of MGP and chronic treatment with warfarin leads to elastocalcinosis,¹³ arterial stiffening and PP elevation in rats.¹⁴ In this model of ISH, we have previously shown that treatment with the endothelin receptor antagonist (ETRA) darusentan induced mineral loss in calcified arteries.¹⁵ Others have also demonstrated that endothelin could be involved in vascular calcification.¹⁶

In bone, dissolution of mineral (during resorption) is a physiological function carried out by osteoclasts, which are specialized cells producing a polarized secretion of H^+ to release calcium and phosphate from the inorganic mineral phase (hydroxyapatite).¹⁷ Protons are derived from carbonic acid, generated by the abundant carbonic anhydrase (CA) isoenzyme II catalyzing the reversible hydration of CO_2 : $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$.¹⁸ In a previous study, we were unable to detect the presence of macrophages or osteoclast-like cells within the calcification areas.¹⁹ In vascular smooth muscle cells, CA II (cytoplasmic) and IV (membrane-bound) are constitutively present and their presence and activity have been proposed to explain the hypotensive effect of thiazide diuretics.²⁰ The aim of the present study was to determine if the regression of MEC induced by an ETRA is mediated by the local activation of carbonic anhydrase.

4.3. Methods

4.3.1. Animals and experimental protocol

Age-matched control (Ctl) male Wistar rats (initial weight of 175 to 200 g or 6 to 7 weeks of age; Charles-River Canada, St-Constant, Québec, Canada) were compared to rats receiving warfarin (20 mg/kg/day in the drinking water) and vitamin K₁ (phyloquinone, 15 mg/kg/day, s.c. ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA) (WVK) for 4 or 8 weeks. Darusentan (an ETRA, 30 mg/kg/day mixed in the chow, Knoll AG, Germany), acetazolamide (CA inhibitor, 100 mg/kg/day mixed in the chow) or both combined were administered from week 5 to 8 in WVK-treated animals (groups +DAR(5-8), +ACTZ(5-8), +DAR+ACTZ(5-8)). Additional WVK-treated rats were administered darusentan for one (+DAR(5)) or 2 weeks (+DAR(5-6)). Each group contained at least 8 rats (see table 1). Finally, in an additional 16 rats, the WVK treatment was stopped after 4 weeks and animals were sacrificed 4 (Placebo(4-8)) or 18 weeks later (Placebo(4-22)). Animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

4.3.2. Hemodynamic parameters

At the end of the treatments, animals were anesthetized (pentobarbital 65 mg/kg intraperitoneally) and a short PE-50 catheter was inserted into the left femoral artery and pushed into the distal abdominal aorta. The catheter was connected to a pressure transducer

to allow the measurement of diastolic and systolic blood pressure (DBP and SBP), and heart rate (HR). Mean arterial pressure and PP were calculated from these values.

4.3.3. Immunohistochemistry and histology

Animals were sacrificed by decapitation under general anesthesia and the aorta and carotid arteries were harvested. A portion of thoracic aorta and the left carotid were frozen at -80°C for subsequent calcium, protein expression (western blot) and carbonic anhydrase activity (only for aorta) evaluation. Another portion of thoracic aorta (5 mm-long) and the right carotid artery were immediately fixed in 4% cacodylate-buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin blocks. Seven μ m-thick aortic and carotid artery sections were mounted on glass slides and deparaffinized with xylene, followed by hydration in graded concentrations of ethanol (from 100% to 50%). Each slide-mounted tissue section was incubated overnight at room temperature with primary antibody against CA II (AB1828, Chemicon® International, Temecula, CA, USA) or CA IV (N-16, Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, USA). Antibodies were used at a dilution of 1:200 (CA II) or 1:50 (CA IV) in 0.2% bovine serum albumin TTBS containing 0.5% of appropriate normal serum (goat or rabbit). After washing, primary antibodies were detected with appropriate secondary antibodies conjugated to biotin. Biotin was detected using a Vectastain ABC-AP Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), and color development was achieved with Fast Red TR/Naphthol AS-MX phosphate alkaline phosphatase substrate with 1 mM levamisole. The sections were counterstained with warm

(57°C) filtered methyl green (Vector Laboratories) for 5 minutes. Adjacent 4 µm-thick slices were stained with von Kossa reagent to localize mineral deposition. Slides from each group were used as negative controls by omitting the primary antibody. Mandibular incisor and molar teeth from untreated rats were used as positive controls. Coverslips were mounted onto glass slides using Kaiser's glycerol jelly mounting medium.

4.3.4. Western Blots Analysis

Aortic levels of CA II and IV (n=4 to 7 per group) were quantified by Western blot analysis using extraction conditions for membrane proteins: 0.6% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% Triton X-100, 0.1% aprotinin, 0.25% phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) in phosphate buffered saline (pH 7.4). Equal quantities of proteins (20 µg for CA II and 40 µg for CA IV) were separated on 12 % sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels. Proteins were detected with specific antibodies for CA II (2 µg/mL; clone M-14; Santa Cruz Biotechnology) and CA IV (2 µg/mL; clone N-16; Santa Cruz Biotechnology).

4.3.5. Carbonic anhydrase activity measurement

Soluble and membrane-bound carbonic anhydrase (II and IV respectively) were separated by a method described previously.²¹ In brief, aortas were homogenized in Sato's buffer (25 mM triethanolamine, pH 8.1, 59 mM Na₂SO₄, 1 mM benzamidine chloride) and samples were centrifuged at 13,000 rpm for 15 minutes at 4°C. The supernatants were centrifuged at 28,000 rpm (141,000 g) for 90 minutes at 4°C to assure that all membrane-

bound CA was in the precipitate, which was then used to measure cytosolic CA activity (n=6 to 10 per group). Optimal dissolution of the precipitates was obtained using a 1-hour incubation at room temperature in a mixed detergent solution (10% SDS and 0.2% saponin in Sato's buffer) with constant agitation followed by centrifugation (13,000 rpm, 30 minutes, 15°C) to precipitate free proteins. These supernatants were used to measure membrane-bound CA activity (n=7 per group).

Carbonic anhydrase activity was measured by a colorimetric method using imidazole-tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) buffer and *p*-nitrophenol as the indicator as described previously.²² One enzyme unit (EU) is the activity that halves the reaction time in 1 ml reaction vessel containing 500 μ l buffer. For the present experiment, a microassay was performed, using 50 μ l of sample and 50 μ l of buffer. Therefore, the number of EU was corrected for the smaller volume as described by Maren.²³ The carbonic anhydrase activity was expressed as EU/mg of protein.

4.3.6. Calcium determination

Aortas and carotid arteries were dried at 55°C in heating blocks, extracted with 10% formic acid (30 μ l/mg of dried tissue) overnight at 4°C and calcium levels were determined by colorimetry through a reaction with *o*-cresolphthalein complexon (Sigma).

4.3.7. Micro-computerized tomography (micro-CT)

Aortic pieces were submitted to micro-CT to visualize mineral deposition. X-ray scans of aorta were performed on a standard desktop micro-CT instrument from Skyscan (model 1072). This instrument has an 80 KeV sealed, air-cooled, microfocus x-ray source with a polychromatic beam derived from a tungsten target and having a spot size of less than 8 μm . For these analyses, the x-ray source was operated at maximum power (80 KeV) and at 100 μA . Images were captured using a 12-bit, cooled CCD camera (1024 by 1024 pixels) coupled by a fiber optics taper to the scintillator.

Chemically fixed aortas were folded (to fit in the chamber) and wrapped in plastic film (to prevent drying) and scanned by micro-CT at a magnification resulting in a pixel size of 8.25 μm . Using a rotation step of 0.9 degrees, the total scanning time was 35 minutes for each rotated aorta, after which approximately 300 cross-sections (slice-to-slice distance of 16.5 μm) were reconstructed to give a three-dimensional distribution of the mineral in the aortas. 3-D reconstructions were performed using the Skyscan tomography software based on triangular surface rendering.

4.3.8. Drugs and statistical analysis

All drugs were purchased from Sigma Chemical Co. (Oakville, ON, Canada) unless specified. Values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed by ANOVA, and when significant ($P < 0.05$), a Bonferonni post-hoc test was done.

Significance was obtained for $P < 0.05/\text{number of comparisons}$ (e.g. for 4 comparisons, the P value for each comparison had to be < 0.0125). When variance was not homogeneous amongst groups, i.e. Bartlett's test < 0.05 (CA II and CA IV activity, and carotid calcium content), or when sample size was too small (CA II and CA IV western blot), a nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test were performed ($P < 0.05$ was considered significant). For all tests, a priori selected comparisons were: Ctl vs WVK and WVK + treatment vs WVK.

4.4. Results

4.4.1. Localization, quantification and activity of carbonic anhydrases II and IV

Immunohistochemistry of CA II revealed that the enzyme was abundant in the adventitia of aortic and carotid artery sections but barely detectable in the media and intima (Figs. 1A and B). In aortic sections from WVK-treated rats, CA II immunostaining was also observed in the calcified (undulated) areas (boxed regions), while this was not true in carotid arteries (Fig. 1C and D). Treatments with darusentan did not modify this pattern of expression in aortic sections (Fig. 1E), but enhanced CA II expression in the media of carotid arteries (Figs 1F).

Carbonic anhydrase IV had a low level of expression in aortic and carotid sections from control and WVK-treated rats (Figs. 2A to D). In contrast, CA IV was abundant throughout the aortic sections of rats treated for one week with darusentan (Fig. 2E) and

gradually returned towards a basal level after 2 and 4 weeks of this treatment (Figs. 2G and I). In contrast, the increased abundance of CA IV occurred only after 4 weeks of darusentan treatment in carotid arteries (Figs. 2F, H and J). Sections from paraffin-embedded hemi-mandibles containing both molar and incisor teeth were used as positive controls and showed the expected distribution of carbonic anhydrase in the maturation-stage enamel organ (data not shown). In the enamel organ, cells positive for carbonic anhydrase II and IV included maturation-stage ameloblasts, and the cells of the papillary layer. As negative control, we used aortic sections from rats of all groups and omitting the primary antibody. All those sections were negative in terms of red staining (not shown).

The immunohistochemistry results were confirmed by Western blot analysis. The amount of CA II tended to increase by the WVK treatment (Fig. 3A). Darusentan given for one or two weeks did not have a significant effect on CA II expression, although there was a tendency for an increase after 4 weeks of treatment ($P>0.05$, Fig. 3A). The WVK treatment had no effect on CA IV protein expression, but darusentan increased it significantly after one week of administration (Fig. 3B). The amount of CA IV protein returned to basal level after 2 and 4 weeks of darusentan treatment.

Eight weeks of WVK treatment had no effect on cytosolic and membrane-bound CA activities as compared to control rats (Figs. 4A and B). The addition of darusentan had no significant effect on cytosolic CA activity (Fig. 4A). Basal membrane-bound carbonic anhydrase activity was lower than that of the soluble isoenzyme. There was a 4.4-fold

increase of membrane-bound activity after one week of darusentan that gradually receded to a non-significant 1.8- and 1.4-fold after 2 and 4 weeks of treatment, respectively (Fig. 4B).

4.4.2. Calcium content in aorta and carotid artery

As shown in Figure 5, treatment of rats with WVK for 4 weeks produced a maximal elevation of calcification that plateaued when the treatment was prolonged for an additional 4 weeks. The administration of darusentan for 4 weeks regressed the amount of calcium present in the vascular wall. However, at the earlier time points (1 and 2 weeks), no changes in calcium content were observed. Although the carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide had no effect on calcification when used alone, it completely blunted the effect of darusentan (Fig. 5). Rats given the 4-week WVK treatment followed by no treatment for 4 or 18 weeks showed a very slow regression trend for a decrease to aortic calcium content: WVK(4): 12.7 ± 1.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of proteins; Placebo(5-8): 12.2 ± 3.1 ; Placebo(5-22): 6.7 ± 1.1 ($P < 0.05$ vs WVK(4)).

Carotid arteries were affected differently than were aortas by the WVK treatment (Table 1). Calcium content continued to rise from week 4 to week 8, to reach values 4 times higher than in the aorta. In addition, darusentan did not induce any mineral loss when administered from the beginning of week 5 to week 8. The von Kossa staining showed that calcification in both the aorta and the carotid arteries was located in the media. In the aorta, calcification was limited to elastic lamellae close to the adventitia, which displayed large

undulations, suggesting an altered vascular architecture (Fig. 6A). In contrast, carotid arteries exhibited calcification throughout the media without large undulations (Fig. 6B). The micro-CT data confirmed that the abundance of calcification was greater in the carotid arteries and also revealed the patchy appearance of MEC (Fig. 6C).

4.4.3. Hemodynamic parameters

Pulse pressure was significantly increased by the WVK treatment after 4 and 8 weeks, mainly attributable to an elevation of SBP (Table 1). All treatments reduced PP to levels halfway between control and WVK values, with the exception of the 2-week darusentan administration, because of greater variability in the data (Table 1).

4.5. Discussion

The major finding of this study, using an experimental model of MEC, is the identification of a novel functional role for membrane-bound carbonic anhydrase, most likely CA IV, in the control of vascular calcification. Moreover, we have shown that the enzyme is regulated by the endogenous endothelin system.

Ectopic calcification (including MEC), once it occurs, has generally been considered as an irreversible phenomenon, though many studies show that it can be prevented. Molecules that inhibit bone resorption, such as biphosphonates,²⁴ and anti-hypertensive drugs including ETRA,^{15, 16} have been shown to prevent MEC. Moreover, glutaraldehyde-fixed aortic valve (GFAV) leaflets showed accelerated and 4 to 5-fold

greater calcification after subcutaneous implantation into osteopontin (OPN)-null and heterozygote mice as compared to wild-type controls,²⁵ suggesting that endogenous OPN normally inhibits calcification. In this last study, a time-dependent mineral dissolution of GFAV calcification was noted in heterozygotes. Binding of OPN to the mineral provided a recognition site for macrophages and giant cells leading to their accumulation at the implant site, to CA II upregulation and to acidification of the surrounding milieu, contributing to the dissolution of mineral on GFAV. We have shown that chronic administration of an ETRA also induced mineral loss in an experimental model of MEC.¹⁵ In line with the valve implant study in OPN heterozygotes, we have also reported local OPN expression at sites of MEC in this model.¹⁹ Moreover, in the present study, we found that CA II was more abundant in calcified regions of the aorta. Thus, there seems to be common players in both conditions of calcified cardiovascular tissues. However, the regression of calcification in the GFAV leaflet and the WVK models may follow distinct mechanisms. Indeed, ED-1 staining, a specific marker for macrophages, was negative in WVK-treated rats and no other histological evidence was seen for the presence of these cells.¹⁹ In addition, the present experiments show that darusentan did not change the vascular activity or distribution of CA II. Moreover, although OPN is overexpressed in the calcified areas,¹⁹ spontaneous regression is not efficient, as suggested by results from the placebo groups. In our model, CA II and OPN could be involved in limiting the extent of aortic MEC, thus explaining the plateau obtained after 4 weeks of WVK treatment. In line with this, calcification continued to progress beyond the 4-week time point in carotid

arteries, where CA II expression was not observed in the arterial media. However, the fact that acetazolamide did not enhance significantly aortic calcification when used alone argues against a role for CA II in limiting the progression of elastocalcinosis, suggesting that OPN may have a more important role in that respect.

While performing the CA activity assay, we made the unexpected observation that the membrane-bound activity was significantly enhanced after one week of darusentan treatment. The major membrane-bound isoenzyme is CA IV, and its localization was thus examined. In contrast to CA II overexpression in calcified areas during WVK treatment, the CA IV isoform activity and localization were not modified during MEC. However, our results show that there was a striking transient upregulation of this isoenzyme during ET receptor blockade, as revealed by immunohistochemistry, western blot and activity measurement approaches. Furthermore, the distribution of CA IV was not limited to calcified areas, but the enzyme appeared throughout the vascular wall. This may explain the remarkable increase in activity detected, as overexpression only in calcified areas would likely have resulted in much smaller increases given the patchy distribution of calcification found by micro-CT. Chronic administration of acetazolamide, a general inhibitor of CA, confirmed the involvement of CA in the regression, as it prevented the mineral loss induced by darusentan. Unfortunately, the absence of specific CA IV inhibitors do not allow for a more precise determination of the isoform involved in this regression process. On the other hand, CA II and CA IV may in fact cooperate to allow mineral dissolution, as suggested for different functions.²⁶ Since CA isoforms are involved in the production of carbonic acid, it

is indeed tempting to speculate that CA IV overexpression during ET receptor antagonism leads to an acidification of the extracellular milieu and a slow but gradual dissolution of the mineral phase in the arterial wall. Indeed, CA IV is membrane-bound and will affect extracellular rather than intracellular pH. However, we have no direct proof of a local pH change to support this hypothesis. The difference in the kinetics of enhanced expression/activity of CA IV and in the reduction of vascular calcium content seems to indicate that a prolonged CA IV hyperactivity is required to decrease the calcium content. The results obtained in carotid arteries also suggest a pivotal role for CA IV in inducing mineral loss. Indeed, CA IV overexpression appeared to be delayed by 2 to 3 weeks, and there was no regression of calcification in the carotid arteries with four weeks of darusentan treatment.

Thus, inhibiting the ET system allows the expression of CA IV that appears to contribute to the regression of MEC, potentially by altering the extracellular microenvironment. The relationship between CA isoenzymes and ET is currently unknown, but we have previously observed ET overexpression during WVK treatment.¹⁵ Depending on the assay system used, ET has been shown to either decrease or increase osteoblast alkaline phosphatase, osteocalcin and OPN production as well as other markers of osteoblast differentiation.²⁷ We have recently developed a VSMC model of calcification, and it is our goal to investigate the mechanism by which ET regulates CA IV.²⁸

We have previously published that 50% ($r^2 = 0.51$) of the changes in PP can be accounted for by changes in aortic calcium content.¹⁴ In the present study, dissociation between calcium content and PP was observed, particularly in the acetazolamide-treated rats. It must be noted that other factors like ventricular ejection, pulse wave reflection, VSMC contraction, fragmentation of elastic fibers and an increase of rigid components (*e.g.* collagen) can influence PP. In this regard, it has been shown that the vasodilatory effect of diuretics (including acetazolamide) are also mediated by a membrane-bound CA isoform, leading to cellular alkalinization, potassium channel activation and cellular hyperpolarization.²⁰ Thus, this effect could account for the reduction in PP and suggest yet another function for CA isoforms in the vascular wall.

In conclusion, our results suggest that the overexpression of ET is essential for the maintenance of WVK-induced elastocalcinosis. Inhibition of the ET system allows the expression of CA IV, a membrane-bound isoform that could reduce the pH of the extracellular milieu to allow the dissolution of minerals accumulated on the elastic lamellae. Thus, our results suggest a new functional role for vascular CA IV that can be induced by a specific pharmacological treatment in a condition of medial elastocalcinosis.

4.6. Acknowledgments

We acknowledge the skillful technical assistance of Isabelle Turgeon and Louise Ida Grondin. Darusentan was kindly provided by Knoll AG. RE and CB receive a stipend from the Rx&D-HRF/ Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and HHD from the Fonds

de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). PM is a scholar of the CIHR, and MDM is a scholar of the FRSQ. Funding was provided by grants from the CIHR to PM and MDM.

4.7. References

1. Blumenthal HT, Lansing AI, Wheeler PA: Calcification of the media of the human aorta and its relation to intimal arteriosclerosis, ageing and disease. *American Journal of Pathology* 1944;20:665-679.
2. Bielak LF, Turner ST, Franklin SS, Sheedy PF, 2nd, Peyser PA: Age-dependent associations between blood pressure and coronary artery calcification in asymptomatic adults. *J Hypertens* 2004;22:719-25.
3. Edmonds ME: Medial arterial calcification and diabetes mellitus. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 2:101-4.
4. Ibels LS, Alfrey AC, Huffer WE, Craswell PW, Anderson JT, Weil R, 3rd: Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am J Med* 1979;66:790-6.
5. Joffres MR, Hamet P, MacLean DR, L'Italien G J, Fodor G: Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens* 2001;14:1099-105.
6. Safar ME: Hypothesis on isolated systolic hypertension in the elderly. *J Hum Hypertens* 1999;13:813-5.
7. Darne B, Girerd X, Safar M, Cambien F, Guize L: Pulsatile versus steady component of blood pressure: a cross-sectional analysis and a prospective analysis on cardiovascular mortality. *Hypertension* 1989;13:392-400.

8. Van Bortel LM, Struijker-Boudier HA, Safar ME: Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension* 2001;38:914-21.
9. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL: Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 2:63-8.
10. Parhami F, Tintut Y, Patel JK, Mody N, Hemmat A, Demer LL: Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. *Z Kardiol* 2001;90:27-30.
11. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC: Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev* 2001;21:274-301.
12. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
13. Price PA, Faus SA, Williamson MK: Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1400-7.
14. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P: A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* 2003;16:103-10.
15. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P: Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2002;20:1597-606.

16. Wu SY, Zhang BH, Pan CS, Jiang HF, Pang YZ, Tang CS, Qi YF: Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. *Peptides* 2003;24:1149-56.
17. Blair HC: How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 1998;20:837-46.
18. Breton S: The cellular physiology of carbonic anhydrases. *Jop* 2001;2:159-64.
19. Essalihi R, Ouellette V, Dao HH, McKee MD, Moreau P: Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: A Role for Endothelin? *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2005;44 (suppl 1):S147-50.
20. Pickkers P, Garcha RS, Schachter M, Smits P, Hughes AD: Inhibition of carbonic anhydrase accounts for the direct vascular effects of hydrochlorothiazide. *Hypertension* 1999;33:1043-1048.
21. Brion LP, Zavilowitz BJ, Suarez C, Schwartz GJ: Metabolic acidosis stimulates carbonic anhydrase activity in rabbit proximal tubule and medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1994;266:F185-95.
22. Brion LP, Schwartz JH, Zavilowitz BJ, Schwartz GJ: Micro-method for the measurement of carbonic anhydrase activity in cellular homogenates. *Anal Biochem* 1988;175:289-97.
23. Maren TH: A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1960;130:26-9.

24. Price PA, Faus SA, Williamson MK: Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:817-24.
25. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM: Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002;161:2035-46.
26. Chegwiddden WR, Carter ND. Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwiddden WR, Carter ND, Edwards YH, ed. *The carbonic anhydrases: New horizons*. Basel: Birkhäuser Verlag, 2000: 13-28.
27. von Schroeder HP, Veillette CJ, Payandeh J, Qureshi A, Heersche JN: Endothelin-1 promotes osteoprogenitor proliferation and differentiation in fetal rat calvarial cell cultures. *Bone* 2003;33:673-84.
28. Essalihi R, Servant M, McKee MD, Moreau P: In vitro Model of Vascular Calcification in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Can J Cardiol* 2004;20 (suppl D):105D [abstract].

4.8. Figures legends

Figure 1. Immunolocalization of carbonic anhydrase II in (A and B) controls rats at 8 weeks (Ctl(8)); (C and D) 8 weeks of warfarin/vitamin K₁ treatment (WVK(8)); and (E and F) 8 weeks of WVK combined with darusentan treatment for the last 4 weeks (+DAR(5-8)). Thoracic aortae mpm(A, C and E) and carotid arteries (B, D and F) were fixed in aldehyde, embedded in paraffin, and analyzed immunohistochemically for carbonic anhydrase II localization. Typical calcified areas are boxed (C and E). Lum: lumen, Med: media, Adv: adventitia.

Figure 2. Immunolocalization of carbonic anhydrase IV in (A and B) control rats at 8 weeks (Ctl(8)); (C and D) 8 weeks of warfarin/vitamin K₁ treatment (WVK(8)); (E and F), (G and H) and (I and J) 1, 2 and 4 weeks of WVK and darusentan treatment after 4 weeks of WVK treatment alone (+DAR(5), +DAR(5-6) and +DAR(5-8)). Thoracic aortae (A, C, E, G and I) and carotid arteries (B, D, F, H and J) were fixed in aldehyde, embedded in paraffin, and analyzed immunohistochemically for carbonic anhydrase IV localization. Lum: lumen, Med: media, Adv: adventitia.

Figure 3. Western blot analyses of CA II (A) and CA IV (B) in rats treated with warfarin/vitamin K₁ (WVK) alone or with darusentan (DAR) for the last week (DAR(5)), last 2 weeks (DAR(5-6)) or last 4 weeks (DAR(5-8)). Values are relative to control samples normalized to 100% (not shown). † P<0.05 vs WVK, Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test.

Figure 4. Administration of warfarin/vitamin K₁ (WVK) had no effect on cytosolic (A) and membrane-bound (B) carbonic anhydrase activities. When darusentan was given after 4 weeks of WVK treatment, cytosolic carbonic anhydrase activity did not change significantly (A). In contrast, darusentan induced a transient activation of membrane-bound carbonic anhydrase (B). Controls at 8 weeks (Ctl(8)); 8 weeks of warfarin/vitamin K₁ treatment (WVK(8)); 1, 2 and 4 weeks of WVK and darusentan treatment after 4 weeks of WVK alone treatment (+DAR(5), +DAR(5-6) and +DAR(5-8)). † $P < 0.05$ vs WVK, Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test.

Figure 5. As compared to control values (open circles) Warfarin/vitamin K₁ (WVK) increased aortic calcium content (closed circles) while darusentan regressed this aortic calcification after 4 weeks of treatment (inverted triangles), acetazolamide had no additional effect on calcification induced by WVK (triangles) but blunted the mineral loss induced by darusentan (diamonds). Darusentan and acetazolamide were administered from the beginning of week 5 to the end of week 8. * $P < 0.05$ vs controls and † $P < 0.05$ vs WVK, ANOVA followed by Bonferonni's correction for multiple comparisons.

Figure 6. Light microscopy of aortic (A) and carotid artery (B) sections from rats treated for 8 weeks with warfarin/vitamin K₁. Sections receiving von Kossa staining were not counterstained to facilitate visualization of the calcified areas. (C) Calcified arteries after 8 weeks warfarin/vitamin K₁ treatment as visualized by 3D reconstruction of x-ray images obtained by micro-CT. Both the thoracic aorta and carotid arteries show extensive

calcification, with patchy mineral deposits (dark punctuate regions) being most abundant in the carotid arteries. Lum: lumen, Med: media, Adv: adventitia.

Table 1. Effect of darusentan and acetazolamide on hemodynamic parameters and carotid artery calcium content in warfarin/vitamin K₁-treated rats.

Groups	n	HR (beats/min)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	MBP (mmHg)	PP (mmHg)	Carotid calcium content (μ g/mg of dry tissue)
Ctl(4)	8	327 \pm 12	104.7 \pm 9.7	65.7 \pm 7.5	78.7 \pm 8.1	39.0 \pm 3.6	1.1 \pm 0.1
WVK(4)	14	396 \pm 17	127.0 \pm 7.0	70.0 \pm 6.0	89.0 \pm 9.1	57.0 \pm 4.1*	25.8 \pm 4.2 *
Ctl(8)	10	369 \pm 11	138.3 \pm 4.6	94.4 \pm 3.0	109.0 \pm 3.5	43.8 \pm 2.3	1.0 \pm 0.3
WVK(8)	8	369 \pm 12	150.9 \pm 4.6	93.0 \pm 2.9	112.3 \pm 3.3	57.9 \pm 2.6*	51.9 \pm 2.1†
+DAR(5)	8	337 \pm 6	145.1 \pm 6.8	98.6 \pm 5.2	114.1 \pm 5.5	46.5 \pm 3.7†	51.0 \pm 1.3
+DAR(5-6)	8	375 \pm 7	142.6 \pm 7.1	92.0 \pm 5.6	108.9 \pm 5.5	50.5 \pm 5.6	52.1 \pm 1.0
+DAR(5-8)	13	334 \pm 16	135.9 \pm 8.6	80.4 \pm 7.2	98.9 \pm 7.5	50.2 \pm 2.1	53.8 \pm 0.1
+DAR+ACTZ(5-8)	9	347 \pm 14	124.3 \pm 4.5	76.3 \pm 4.1	92.3 \pm 4.0	48.0 \pm 3.0†	54.0 \pm 1.2
+ACTZ(5-8)	13	312 \pm 12	132.7 \pm 6.9	84.8 \pm 5.6	100.8 \pm 6.0	47.9 \pm 2.3†	49.1 \pm 2.5

Ctl(4) and Ctl (8): Controls at 4 and 8 weeks; WVK(4) and WVK(8): 4 and 8 weeks of warfarin/vitamin K₁ treatment; +DAR(5), +DAR(5-6) and +DAR(5-8): 1, 2 and 4 weeks of WVK and darusentan treatment after 4 weeks of WVK alone; +DAR+ACTZ(5-8): 8 weeks of WVK combined with darusentan and acetazolamide treatment for the last 4 weeks;

+ACTZ(5-8): 8 weeks of WVK combined with acetazolamide treatment for the last 4 weeks; HR: heart rate; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; MBP: mean blood pressure; PP: pulse pressure. * $P < 0.05$ vs age-matched Ctl, † $P < 0.05$ vs WVK(8) and ‡ $P < 0.05$ vs age-matched Ctl and WVK(4). See methods for statistical analysis details.

Figure 1 Essalihi et al.

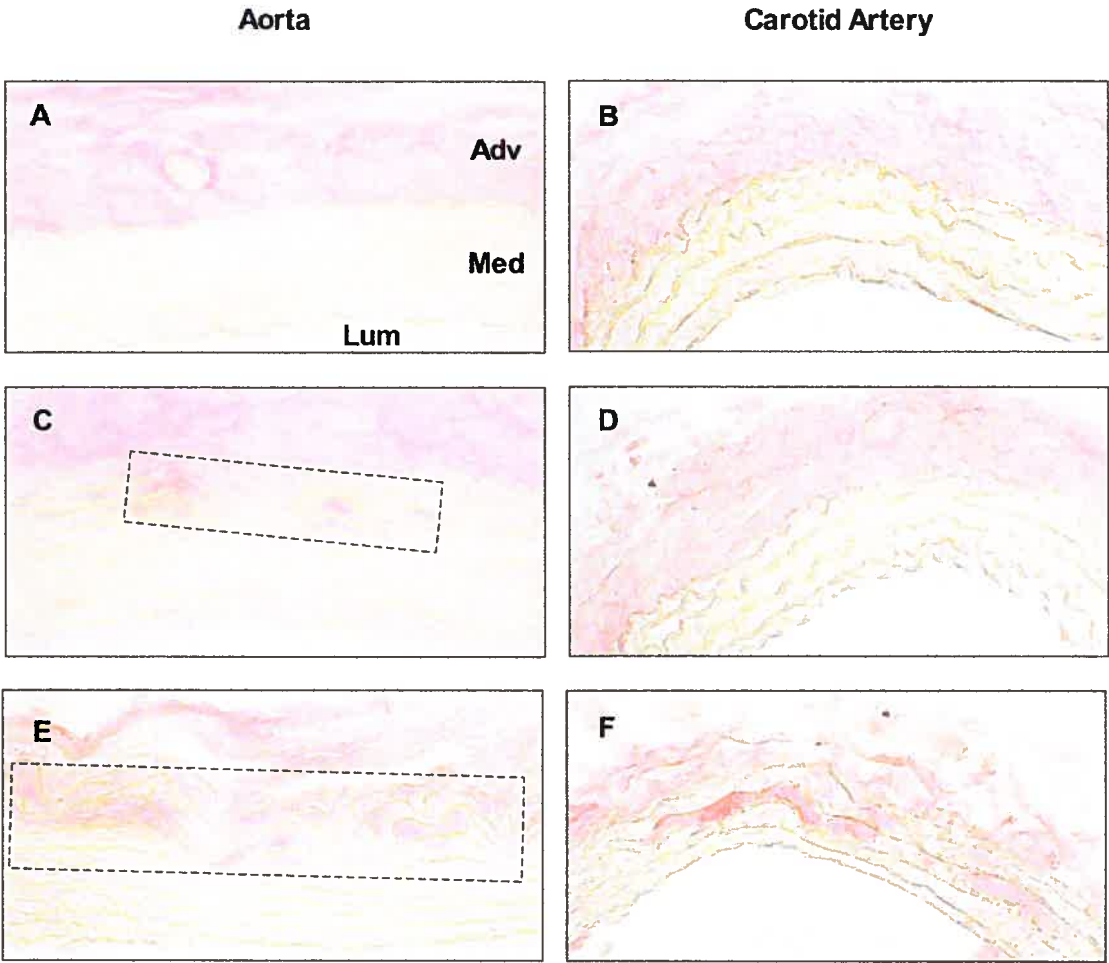


Figure 2 Essalihi et al.

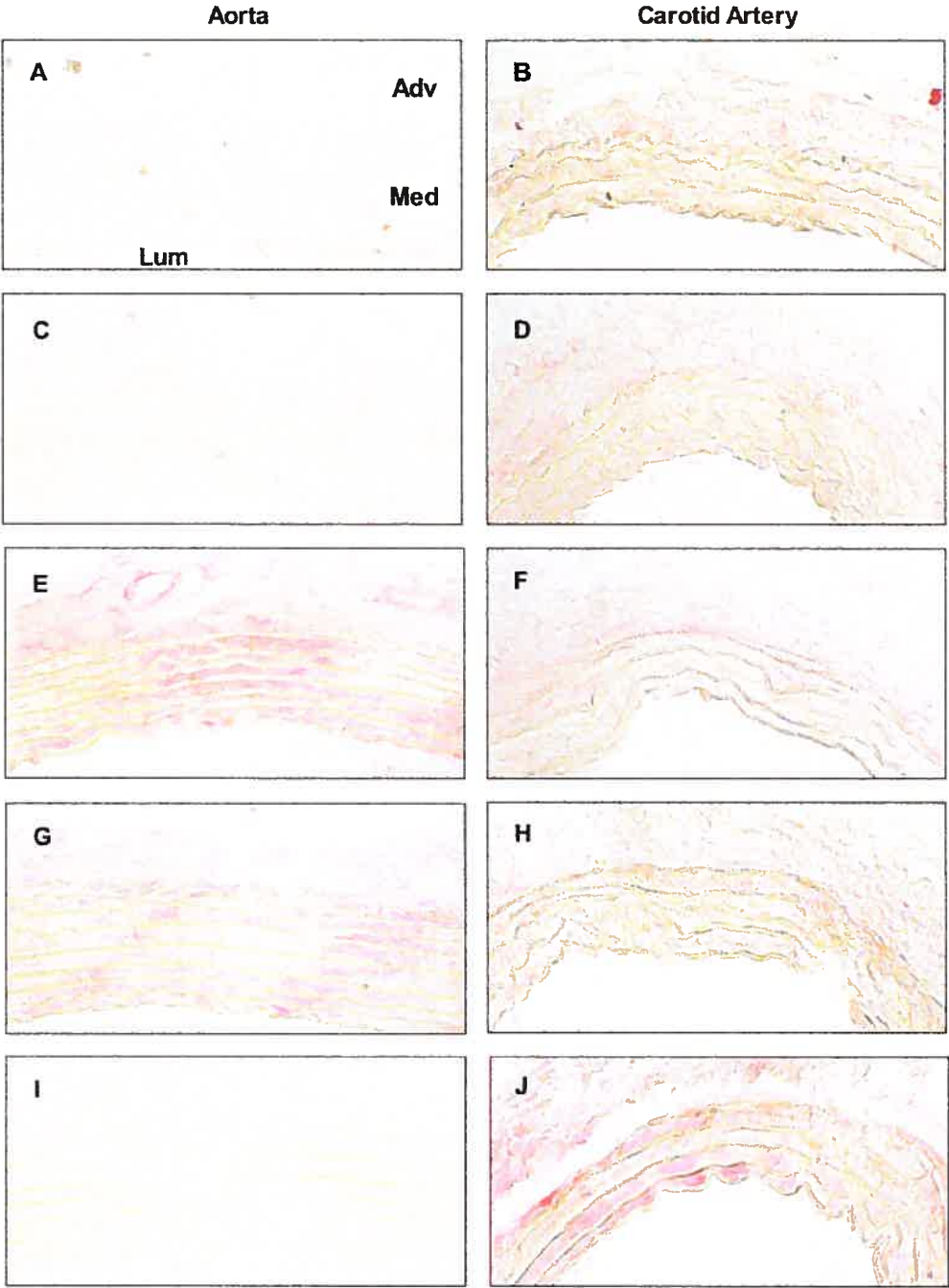


Figure 3 Essalihi et al.

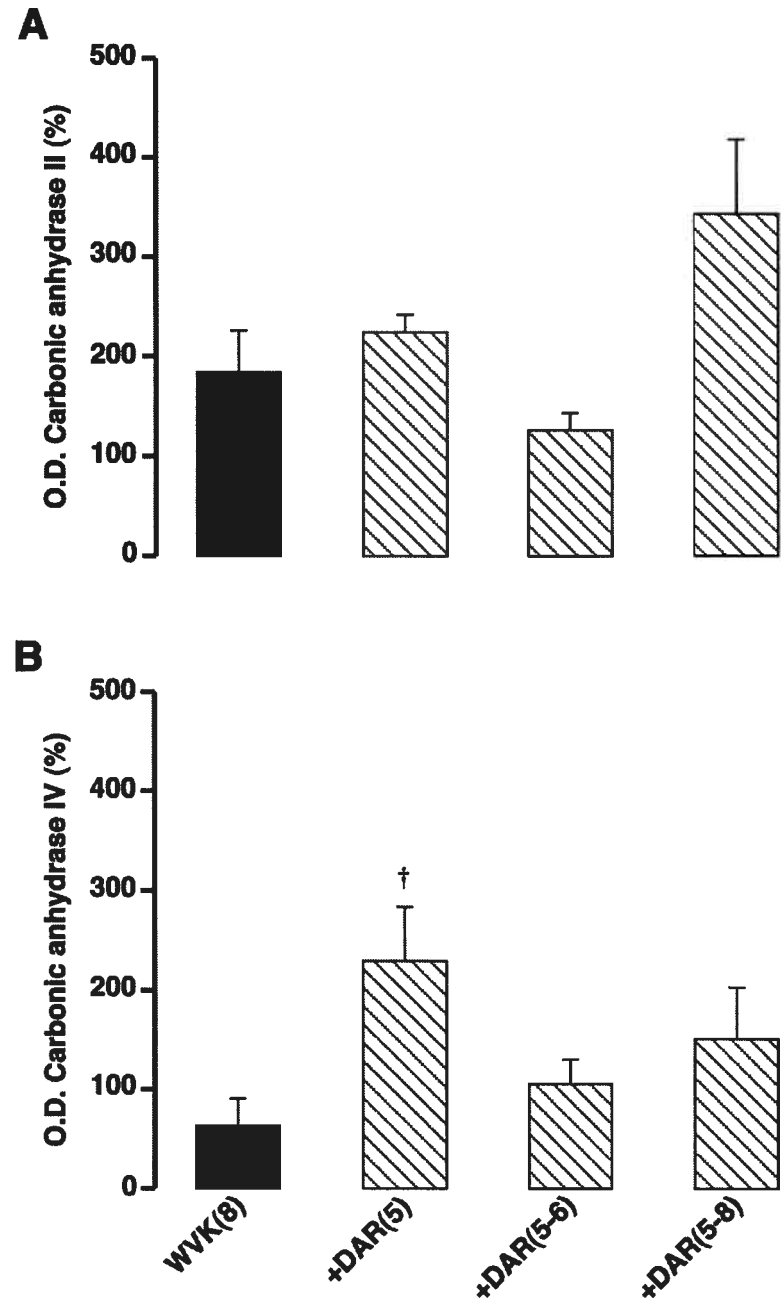


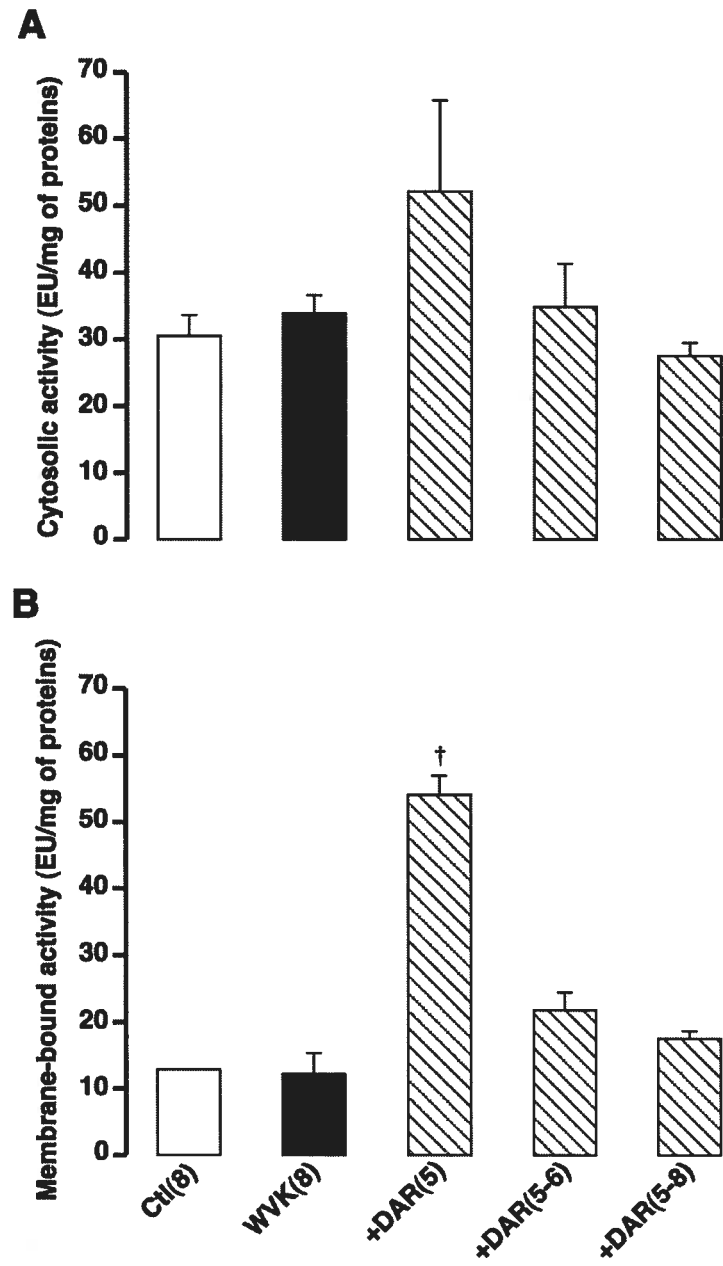
Figure 4 Essalhi et al.

Figure 5 Essalihi et al.

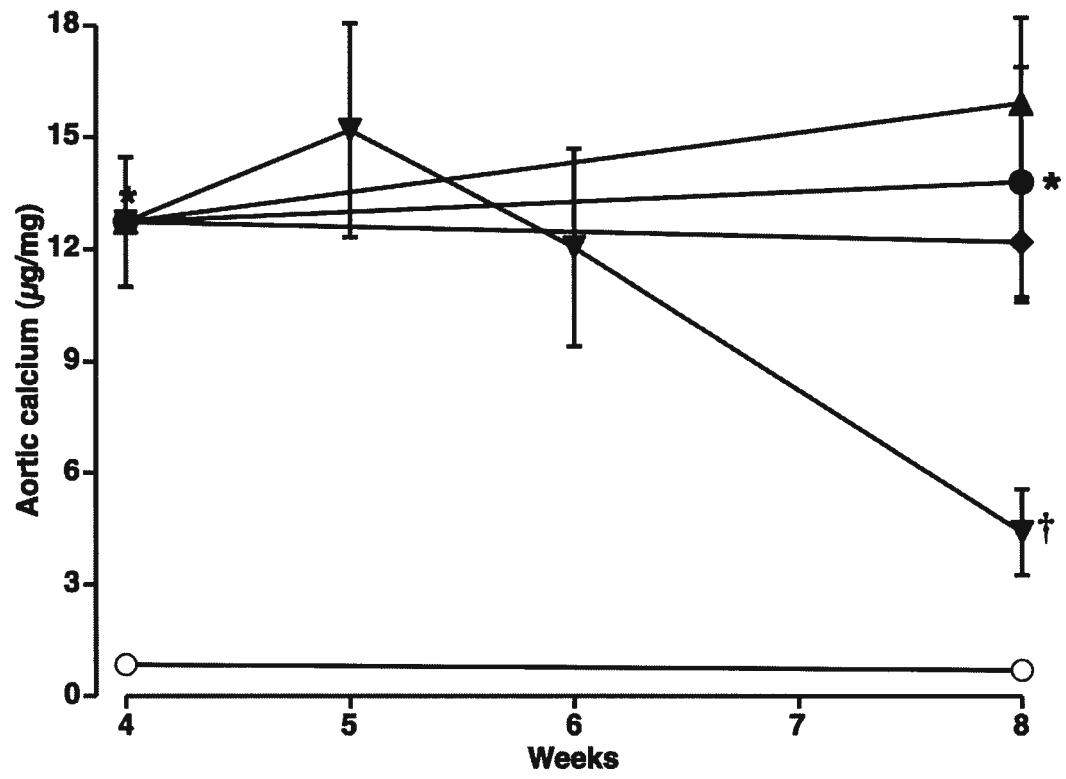
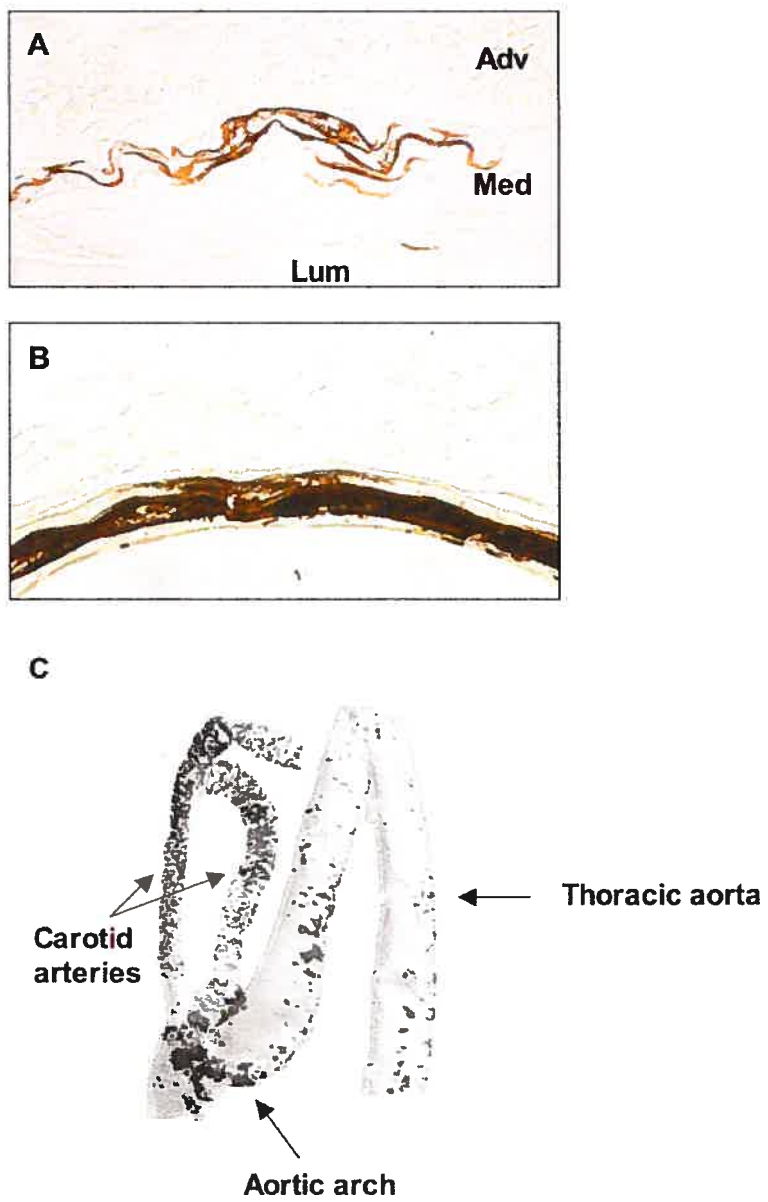


Figure 6 Essalihi et al.



Chapitre 5. Distinct Effects of Amlodipine Treatment on Vascular Elastocalcinosis and Stiffness in a Rat Model of Isolated Systolic Hypertension

Rachida Essalihi ^a, Maarten L. Zandvliet ^a, Simon Moreau ^a, Liz-Ann Gilbert ^a, Cyrille Lenoël ^a, Fahima Nekka ^a, Marc D. McKee ^b and Pierre Moreau ^a

^a Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, and ^b Faculty of Dentistry, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Short Title: Essalihi et al. Amlodipine and isolated systolic hypertension

Sources of support:

The authors acknowledge the financial support of Pfizer Canada in the form of an unrestricted research grant. RE, MDM and PM are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). FN holds a University Faculty Award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Conflicts of interest: This study was funded by an unrestricted research grant from Pfizer Canada Inc.

Address for correspondence:

Pierre Moreau, Ph.D.

Associate Professor, Faculty of Pharmacy Phone: (514) 343-6111 x3342

Université de Montréal Fax.: (514) 343-7073

2900 Édouard-Montpetit

Pavillon Jean-Coutu, room 3197 e-mail: [REDACTED]

P.O. Box 6128, Stn "Centre-Ville"

Montréal, Québec

H3C 3J7 Canada

5.1. Abstract

Objective - Medial elastocalcinosis contributes to the development of large artery stiffness and isolated systolic hypertension (ISH). Since amlodipine, a calcium channel blocker, lowers pulse pressure in patients with ISH, our aim was to determine if it influences elastocalcinosis.

Methods – **PREVENTION** : Control male Wistar rats were compared to rats receiving warfarin ($20 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$) with vitamin k_1 ($15 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$) alone (WVK) or in association with amlodipine ($15 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$) for 4 weeks. **REGRESSION** : Control rats were compared with rats treated only with WVK for 8 weeks or in combination with amlodipine during the last 4 weeks.

Results – Inactivation of matrix Gla protein by WVK for 4 or 8 weeks increased calcium content by 10 and 25 fold ($P < 0.05$) in the aorta and carotid arteries, respectively. The treatment also induced a significant elevation of pulse wave velocity (PWV) and pulse pressure (PP) by a selective augmentation of SBP over DBP. Amlodipine prevented and decreased aortic medial elastocalcinosis and PP elevation. However, amlodipine had no effect on carotid calcification in both protocols. Although amlodipine prevented the increase in aortic stiffness, it did not reduce PWV and fibrosis associated with calcified areas during the regression protocol.

Conclusion – The clinical efficacy of amlodipine in reducing cardiovascular events in ISH could be explained by its beneficial effect on vascular calcification. However, its lack of effect on PWV and collagen deposition suggests that amlodipine may reduce PP mainly by a mechanism involving peripheral vasodilation in this experimental model.

Keywords - Isolated systolic hypertension, pulse pressure, pulse wave velocity, vascular calcification, calcium channel blockers.

5.2. Condensed abstract

Medial elastocalcinosis contributes to large artery stiffness and isolated systolic hypertension (ISH). Since amlodipine is used to treat ISH, its effect on elastocalcinosis was studied in the warfarin/vitamin K (WVK) ISH model. Administration of WVK increased aortic and carotid calcium content, pulse pressure and pulse wave velocity (PWV), a measure of arterial stiffness. Although amlodipine decreased aortic elastocalcinosis and pulse pressure, it did not reduce PWV and fibrosis associated with calcified areas. The reduction of clinical cardiovascular events in ISH by amlodipine could be explained by a reduction of pulse pressure through peripheral vasodilation, but not by a significant improvement of arterial stiffness, as suggested by this study.

5.3. Introduction

During aging, large arteries undergo a gradual fragmentation of their elastic network, calcification of medial elastic fibers (medial elastocalcinosis or MEC), and increased deposition of more rigid matrix proteins like collagen [1-3]. These alterations produce a gradual stiffening of conduit arteries that reduces the aortic dampening of the cardiac systolic ejection and leads to an increase in systolic and pulse pressures [2-4]. Elastocalcinosis can occur following the inactivation of matrix Gla protein (MGP), which is a potent inhibitor of vascular calcification [5]. During human aging, impaired carboxylation of MGP has been associated with intimal and medial calcification [6], and low levels of MGP have been found in the media of arteries of diabetic patients with MEC [7]. Experimentally, MGP carboxylation, necessary for its activity, can be inhibited by high doses of warfarin and bleeding can be prevented by concomitant administration of Vitamin K₁. Indeed, it prevents the inhibition of coagulation factor synthesis by the liver and it does not interfere with the inhibition of MGP carboxylation in arteries [8]. Thus, chronic warfarin and vitamin K (WVK) administration in rats induces MEC in large arteries and reproduces isolated systolic hypertension (ISH), which results in elevated systolic and pulse pressures and pulse wave velocity, but normal mean blood pressure [9].

Isolated systolic hypertension is very prevalent in the elderly population [10], and elevated pulse pressure (PP) is as an independent cardiovascular risk factor [11, 12]. It is thus not surprising that antihypertensive drugs that are effective in reducing pulse pressure

in patients with ISH significantly improve outcomes [13]. Calcium channel blockers (CCB) have been shown to reduce cardiovascular mortality in the elderly with ISH [14]. However, it remains to be determined if the beneficial effect is due to peripheral vasodilation or to an improvement of the pathophysiological processes involved in ISH. Indeed, PP is the sum of the forward and reflexive pressure waves, and a reduction of PP can be attributable to an improvement of large artery stiffness, thus reducing the amplitude of the forward pressure wave, or to a decrease of peripheral vascular resistance, reducing the reflexive wave.

We have recently shown that in the WVK model of MEC, blocking the endothelin (ET) system leads to mineral loss in large arteries, and to an improvement of PP, while a diuretic and an AT1-receptor antagonist had limited effects [15]. Interestingly, CCB are known to inhibit some of the effects of ET on their effector cells, such as vascular smooth muscle cells [16, 17]. Furthermore, CCB have been reported to reduce the endothelial production of ET [18, 19]. Thus, this study was designed to test the ability of amlodipine, a widely used dihydropyridine CCB, to prevent and regress MEC, and its associated hemodynamic consequences, induced by the WVK treatment.

5.4. Methods

5.4.1. Experimental design and treatments

In the prevention protocol, control male Wistar rats (CTL, 175-200g, Charles River Canada, St-Constant, Québec) were compared to rats receiving the combination of sodium

warfarin ($20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in their drinking water) and vitamin K_1 (phylloquinone, $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ injected subcutaneously 3 times a week) for 4 weeks (WVK4). Half of the WVK-treated rats also received amlodipine, $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in the chow during the same period (+Amlo1-4). Dosages of drugs were adjusted according to water (warfarin) or food (amlodipine) intake 3 times a week. Phylloquinone was started one week prior to the administration of warfarin to prevent initial bleeding.

In the regression protocol, control rats were compared to rats treated with WVK for 8 weeks alone (WVK8) or in combination with amlodipine for the last 4 weeks (+Amlo5-8). Each of the 6 groups (including both protocols) contained 8 to 10 rats. The Animal Care and Use Committee of Université de Montréal approved these experimental protocols.

5.4.2. In vivo hemodynamic measurements

Rats were weighed before vitamin K_1 subcutaneous injections and weekly thereafter. At the end of treatments, animals were anesthetized by intraperitoneal injection (pentobarbital $65 \text{ mg kg}^{-1} \text{ i.p.}$) and a short polyethylene (PE-50) catheter was inserted into the left femoral artery. A second polyethylene catheter (PE-50 welded to an intravascular PE-10 segment) was inserted into the aortic arch via the left carotid artery. Catheters were connected to pressure transducers and signals recorded at 500 Hz to allow the measurement of diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR). Mean blood pressure (MBP), and PP were calculated from these values. At the end of the experiment, animals were killed and the aorta fully exposed. The distance between the tips

of the catheters was measured (l) and pulse wave velocity (PWV) was calculated by dividing the propagation distance (l) by the propagation time (t), expressed in units of centimeters per second. The manual "foot-to-foot" technique was used to determine "t" between the two catheters as previously described [9, 20]. At least ten normal consecutive waveforms were individually analyzed and averaged. If an abnormal waveform (irregular or incomplete) was detected within the ten cardiac cycles, it was rejected and the next was measured. Finally, the carotid arteries and the aorta were harvested for further analyses.

5.4.3. Determination of calcium content and localization

One-cm-long thoracic aorta segments downstream from the end of the arch, and all of the right carotid arteries, were dried at 55°C in heating blocks and extracted with 10% formic acid (30 μ L/mg of dried tissue) overnight at 4°C. Calcium levels in acid extracts were determined by a colorimetric method using a reaction with o-cresolphthalein complexone, according to the manufacturer's specifications (Sigma). Data was calculated as μ g/mg of dried tissue, using a calibration curve.

A small portion (5 mm ring) of the thoracic aorta was immediately fixed after dissection in cacodylate phosphate-buffered paraformaldehyde 4%, embedded in paraffin blocks and 4 μ m-thick sections were stained using the von Kossa protocol to localize mineral deposits.

5.4.4. Determination of collagen content

Cross sections of the aorta were stained with Picosirius red to determine collagen composition, as previously described [21]. Stained sections were examined by light microscopy and images photographed with a digital camera (Nikon) at a final magnification of 400x. To obtain the percentage of area occupied by collagen in the calcified media (CM) and the non-calcified media (NM), NIH Image software was calibrated with a micrometric slide. Images were converted to 8 bits grayscale, and using rectangular selections, we measured the total media area (A_t) and the mean grey value within this selection. The lower threshold level was set to 0, and the upper threshold level to the mean grey value of A_t . The total area of a smaller rectangular selection (1500-1700 μm^2) in an undulating (highly undulated elastic lamellae are typically calcified) portion of the image was then measured (A_{CM}). In this selection, the area occupied by pixels above the threshold and corresponding to collagen (A_c) was measured. $A_c/A_{CM} \times 100$ representing the percentage of area occupied by collagen in the calcified area was then calculated. The same procedure was repeated in a normal, non-undulated section of the media (NM) to provide the A_c/A_{NM} percentage.

5.4.5. Quantification of elastic lamellae undulations

In order to quantify the extent of distortion of each elastic lamellae, aortic cross-sections were processed with Verhoeff's stain for elastin and digitized (see above). The images were processed in two consecutive steps developed in the MatLab environment (<http://www.mathworks.com/academia/>): lamellae extraction and corresponding signal

analysis. In order to extract the curves representing the elastin lamellae, we have developed a semi-automated algorithm (requiring Matlab image analysis toolbox) that tracks the lamellae from a starting point on one edge of its extremities, and then follows the darkest point to fully autotrace the lamellae. In the second step, we used a signal analysis strategy to flatten the global curvature of the lamellae with a high-pass filter (using Matlab signal analysis toolbox), since it is a property of the artery but not of the lamellae. Each path was then analyzed in terms of its associated signal energy using an integration of its energy spectrum. This energy value thus represents the total oscillations contributing to the signal. Typically, linear elastic lamellae have a low signal energy (below 20), while undulated ones have a high signal energy (above 20). For a given artery, elastic lamellae with values below and above 20 were averaged separately, providing an undulation score in the normal and calcified media.

5.4.6. Drugs and statistical analysis

Amlodipine was kindly provided by Pfizer Canada. Sodium warfarin and phylloquinone were purchased from Sigma-Aldrich Co. Values are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by ANOVA, and when significant ($P < 0.05$), a Bonferonni post-hoc test was done. Significance was obtained for $P < 0.05/\text{number of comparisons}$ (e.g. for 2 comparisons, the P value for each comparison had to be < 0.025). For all tests, a priori selected comparisons were: CTL vs WVK and WVK + Amlo vs age-matched WVK.

5.5. Results

5.5.1. Calcium content in tissues

In aortas, calcium content increased significantly by approximately 11-fold at 4 weeks of WVK treatment (**Fig 1A**). As previously reported, the amount of calcium accumulation reached a plateau after 4 weeks of treatment and thus remained at similar values at 8 weeks. The CCB amlodipine not only totally prevented the elevation of aortic calcium content induced by WVK, but it also produced a significant regression of calcification when administered from weeks 5 to 8 (**Fig 1A**). In carotid arteries, calcium content increased by 21- and 31-fold at 4 and 8 weeks of WVK treatment, respectively (**Fig 1B**). In contrast to the aorta, the amount of calcium did not reach a plateau, and amlodipine did not significantly prevent nor regress carotid calcification (**Fig 1B**).

Von Kossa staining for mineral revealed that aortic and carotid calcification was localized to medial elastic lamellae. In the aorta, lamellae closest to the adventitia were preferentially mineralized, while in carotids the staining occurred in lamellae throughout the media (data not shown).

5.5.2. Hemodynamic parameters

Treatment of rats with WVK for 4 and 8 weeks significantly increased central PP (**Fig 2A**), an effect attributable to a selective elevation of SBP over DBP (**Table 1**). Moreover, MBP and HR were unchanged in the WVK group at 4 and 8 weeks (**Table 1**).

Administration of amlodipine prevented and decreased significantly the elevation of PP induced by WVK in the prevention and regression protocols (**Fig 2A**).

Pulse wave velocity, an index of aortic stiffness, tended to increase at 4 weeks of WVK treatment, and reached statistical significance at 8 weeks (**Fig 2B**). Amlodipine had no significant effect on this parameter (**Fig 2B**).

5.5.3. Collagen content and undulation score

In order to resolve the discrepancy between the extent of calcification and the rigidity of the aortic wall, we have evaluated the extent of collagen deposition and the undulation score of the elastic lamellae. In calcified areas, the collagen content was increased by more than 2-fold as compared to uncalcified areas in the same arteries (**Fig 3**). Amlodipine had no significant effect on collagen content in the normal media, and it remained elevated in the calcified areas. By definition, the undulation score of elastic lamellae was higher in calcified areas of the media than in the non-calcified media (**Fig 4**). The score was significantly reduced by amlodipine treatment, albeit only partially, as compared to WVK-treated rats. In each group, the same average number of elastic lamellae was found to be above the threshold and included in the score calculation (data not shown).

5.6. Discussion

The major finding of this study is that the calcium channel blocker amlodipine not only prevents aortic MEC, but also induces mineral loss when elastocalcinosis had become

established in a rat model of ISH. Interestingly, MEC was associated with extracellular matrix (collagen) changes that were not significantly improved by amlodipine, thus contributing to the maintenance of the rigidity of the vascular wall despite regression of MEC.

Using the WVK model or the vitamin D-nicotine calcium overload model, many investigators have shown that vascular MEC can be prevented with antihypertensive molecules such as diuretics, AT₁ and ET receptor antagonists [15], by other CCB like verapamil [22] and by PPAR gamma agonists [23]. Moreover, drugs that inhibit bone resorption, such as bisphosphonates, also prevent MEC induced by warfarin and vitamin D in a rat model, suggesting that the inhibition of bone resorption could influence arterial calcification [24]. Because bisphosphonates do not significantly lower serum levels of calcium and phosphate, it was suggested that soft-tissue calcification is promoted by crystal nuclei generated at sites of bone resorption that travel in the blood and lodge in the arterial wall [24]. Many studies suggest that the effects of CCB are not limited to the cardiovascular system, but might also affect calcium metabolism in the skeleton due to the presence of L-type calcium channels on bone cells [25]. Redlich et al. [26] showed that amlodipine reduced basal and parathyroid hormone-induced bone resorption in an *in vitro* model, data consistent with the hypothesis that amlodipine might prevent MEC in part through the inhibition of bone resorption.

Ectopic calcification, has generally been considered as an irreversible phenomenon. However, Giachelli and collaborators have shown that osteopontin promotes the regression of calcification of glutaraldehyde-fixed aortic valve [27]. Moreover, we have demonstrated that an ET receptor antagonist induces aortic mineral loss in the WVK model by the activation of a membrane-bound carbonic anhydrase (CA IV) [15, 28]. In the present study, we have demonstrated that amlodipine regresses aortic MEC after 4 weeks of administration. Interestingly, 24 weeks of verapamil treatment, another CCB, was shown previously to regress calcification in coronary arteries [29]. The results were obtained in the model of vitamin D-nicotine calcium overload, which is pathophysiologically different from our model, lending strong support to a central role for calcium channels in the calcification process, independent of its cause. Considering the greater impact of the aorta than the coronary circulation on systemic hemodynamics, the new results reported here may be more relevant to ISH. Moreover, it appears that the effects observed in one vascular segment are not necessarily observed in others. Indeed, in carotid arteries, where MEC was 2 to 3-fold higher than in the aorta, amlodipine had no significant impact. We have previously shown that the carotid arteries respond more slowly to endothelin receptor antagonism than the aorta in terms of carbonic anhydrase expression [28]. Although we do not have a definitive explanation for this heterogeneity, different segments of the arterial tree have various developmental origins, with the aortic arch and carotid arteries deriving from the ectoderm, while the thoracic aorta is from the mesoderm [30]. Hence, this

difference in origin may impact on the ability of the vascular cells to respond to changes in their environment.

One striking observation was that although MEC was reduced significantly in the amlodipine-treated rats, there was no associated reduction in aortic stiffness, as assessed by PWV measurement. In order to resolve this discrepancy, we studied local collagen content and an index of elastic lamellae distortion (undulation score) with the assumption that MEC could trigger a fibrotic response not as readily reversible as MEC itself, thus maintaining the elastic lamellae in their undulated state. Quantification of collagen deposition clearly showed that the calcified media was also accompanied by fibrosis and that treatment with amlodipine did not reduce the deposition of this rigid, fibrillar extracellular matrix component. Our results are consistent with reports suggesting that amlodipine does not improve a circulating marker of collagen synthesis in hypertensive patients with myocardial fibrosis [31, 32]. Moreover, in wound healing, CCB have been reported to promote collagen cross-linking [33]. In accordance with our postulate, the distortion of the elastic lamellae, as calculated by their undulation score, was also still significantly elevated after amlodipine treatment.

In one clinical trial, amlodipine has been shown to be neutral on PWV in hypertensive patients, despite a reduction of 27 mm Hg in systolic blood pressure and of 18 mm Hg in radial PP [31]. Our hemodynamic results are in agreement with a reduction of 33 mm Hg in SBP and 11 mm Hg in central PP. We have previously reported that 50% ($r^2 =$

0.51) of the changes in PP can be accounted for by changes in aortic calcium content [9]. It is thus tempting to speculate that amlodipine improves PP by reducing MEC. However this would be expected to occur by a reduction of arterial stiffness, which was not the case as far as PWV is concerned. Factors other than arterial rigidity can influence PP, like ventricular ejection and pulse wave reflection [4]. The speed of the reflected wave, favoring its superimposition on the forward wave to produce the final PP, is influenced by peripheral resistance [34]. Calcium channel blockers are well-known peripheral vasodilators [35], and this effect probably explains, at least in part, how amlodipine decreases PP in WVK-treated rats and in hypertensive patients. Alternatively, since the reduction of MEC by amlodipine is not be homogeneous throughout the arterial tree, other vascular segments such as the aortic arch which is related to the carotid arteries in terms of development, could contribute more importantly to PWV than more distal segments of the aorta.

5.7. Conclusion

Taken together, our results lead us to the following interpretation of the effects of amlodipine on the arterial wall and on systemic hemodynamics. Amlodipine has a favorable effect on medial elastocalcinosis when started either before or after its establishment, reducing the amount of mineral in the vascular wall. However, amlodipine has little effect on the local fibrosis in the vicinity of the calcified areas and does not significantly improve the rigidity of the arteries. Thus, the beneficial effect of amlodipine on PP cannot be attributable to effects on the arterial wall of large arteries, but rather to

vasodilatory effects at the level of smaller resistance arteries. The reduction of PP in patients with ISH will improve the outcomes, but amlodipine may not modify the disease process responsible for the increased stiffness of large arteries. It is however expected that long-term treatment of younger hypertensive patients with amlodipine could delay the progression of MEC development and reduce the subsequent incidence of ISH in older individuals.

5.8. Acknowledgements

The authors acknowledge Louise Ida Grondin for expert technical assistance and Jun Li for fruitful scientific discussions.

5.9. References

1. Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int* 1994; 54:268-73.
2. Safar ME. Hypothesis on isolated systolic hypertension in the elderly. *J Hum Hypertens* 1999; 13:813-5.
3. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 2005; 66:307-17.
4. Izzo JL, Jr., Shykoff BE. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement, and treatment. *Rev Cardiovasc Med* 2001; 2:29-34, 37-40.
5. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386:78-81.
6. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, et al. Novel Conformation-Specific Antibodies Against Matrix {gamma}-Carboxyglutamic Acid (Gla) Protein. Undercarboxylated Matrix Gla Protein as Marker for Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1629-1633.
7. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999; 100:2168-2176.

8. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999; 82:1764-7.
9. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* 2003; 16:103-10.
10. Farsang C, Sleight P. Isolated systolic hypertension: cardiovascular risk and treatment benefits. *J Hypertens* 2001; 19:2279-81.
11. Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L. Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension* 1998; 32:560-4.
12. Staessen JA, Gasowski J, Wang JG, Thijs L, Den Hond E, Boissel JP, et al. Risks of untreated and treated isolated systolic hypertension in the elderly: meta-analysis of outcome trials. *Lancet* 2000; 355:865-72.
13. Waeber B. Trials in isolated systolic hypertension: an update. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5:329-36.
14. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhager WH, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet* 1997; 350:757-64.

15. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2002; 20:1597-606.
16. Kiowski W, Luscher TF, Linder L, Buhler FR. Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 1991; 83:469-75.
17. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, et al. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:3915-8.
18. Kobayashi N, Mori Y, Mita S, Nakano S, Kobayashi T, Tsubokou Y, et al. Effects of cilnidipine on nitric oxide and endothelin-1 expression and extracellular signal-regulated kinase in hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 422:149-57.
19. Yakubu MA, Leffler CW. L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels in cerebral microvascular endothelial cells and ET-1 biosynthesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C1687-95.
20. McDonald DA. Regional pulse-wave velocity in the arterial tree. *J Appl Physiol* 1968; 24:73-8.
21. Dao HH, Lemay J, de Champlain J, deBlois D, Moreau P. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* 2001; 19:1965-73.

22. Schraven E, Trottnow D, Nitz RE. Inhibition of vitamin D3-induced vascular calcification by carbocromen. *Adv Myocardiol* 1983; 4:263-7.
23. Gaillard V, Casellas D, Seguin-Devaux C, Schohn H, Dauca M, Atkinson J, et al. Pioglitazone improves aortic wall elasticity in a rat model of elastocalcinotic arteriosclerosis. *Hypertension* 2005; 46:372-9.
24. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:817-24.
25. Nishiya Y, Sugimoto S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biol Pharm Bull* 2001; 24:628-33.
26. Redlich K, Pietschmann P, Stulc T, Peterlik M. Comparative study on the effect of calcium channel blockers on basal and parathyroid hormone-induced bone resorption in vitro. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80:262-5.
27. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002; 161:2035-46.
28. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, et al. Regression of Medial Elastocalcinosis in Rat Aorta. A New Vascular Function for Carbonic Anhydrase. *Circulation* 2005; 112:1628-1635.

29. Fleckenstein-Grun G, Thimm F, Frey M, Matyas S. Progression and regression by verapamil of vitamin D3-induced calcific medial degeneration in coronary arteries of rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:207-13.
30. Shimizu M, Pelisek J, Nikol S. Vasculogenesis and angiogenesis depend on the developmental origin in the arterial tree. *Curr Med Chem* 2002; 9:1619-30.
31. Rajzer M, Klocek M, Kawecka-Jaszcz K. Effect of amlodipine, quinapril, and losartan on pulse wave velocity and plasma collagen markers in patients with mild-to-moderate arterial hypertension. *Am J Hypertens* 2003; 16:439-44.
32. Lopez B, Querejeta R, Varo N, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL, et al. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104:286-91.
33. Bhaskar HN, Udupa SL, Udupa AL. Effect of nifedipine and amlodipine on dead space wound healing in rats. *Indian J Exp Biol* 2005; 43:294-6.
34. Safar ME. Peripheral pulse pressure, large arteries, and microvessels. *Hypertension* 2004; 44:121-2.
35. Palma-Gamiz JL. High blood pressure and calcium antagonism. *Cardiology* 1997; 88 Suppl 1:39-46.

Table 1. Effect of warfarin/vitamin K₁ alone or with amlodipine on central hemodynamic parameters.

	CTL	WVK4	+Amlol-4	WVK8	+Amlol5-8
HR (BPM)	376 ± 6	410 ± 13	359 ± 14	369 ± 13	360 ± 13
Central SBP (mmHg)	138.7 ± 2.4	155.4 ± 9.3*	123.4 ± 2.7†	158.8 ± 5.7*	125.5 ± 3.9†
Central DBP (mmHg)	110.6 ± 2.1	112.4 ± 6.4	95.1 ± 2.0†	115.7 ± 2.8	93.6 ± 5.1†
Central MBP (mmHg)	120.0 ± 2.1	126.8 ± 7.1	104.5 ± 2.2†	130.1 ± 3.4	104.3 ± 4.5†

Controls at 4 and 8 weeks are pooled (CTL); 4 and 8 weeks of warfarin/vitamin K₁ treatment (WVK4 and WVK8); HR: heart rate; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; MBP: mean blood pressure. Central pulse pressure is presented in figure 2A.

5.10. Figures legends

Figure 1. Warfarin- and vitamin K₁- mediated calcification is indicated by filled squares. Prevention (weeks 1 to 4, filled circles) and regression (weeks 5 to 8, open circles) efficacy of amlodipine are presented for aortic (**A**) and carotid (**B**) arterial calcification. The values at 0 weeks represent the pooled average of control rats sacrificed at 4 and 8 weeks. *P<0.05 versus control rats, †P<0.05 versus age-matched warfarin / vitamin k₁-treated rats.

Figure 2. Consequences of vascular calcification induced by warfarin and vitamin K₁ on central pulse pressure (**A**) and pulse wave velocity (**B**) during the prevention (weeks 1 to 4, filled squares) and regression (weeks 5 to 8, filled squares) protocols. The efficacy of amlodipine is represented by filled circles (prevention) and open circles (regression). The values at 0 weeks represent the pooled average of control rats sacrificed at 4 and 8 weeks. *P<0.05 versus control rats, †P<0.05 versus age-matched warfarin / vitamin k₁-treated rats.

Figure 3. Representative Picosirius red stained aortic section of a rat treated with warfarin and vitamin K₁ for 8 weeks (WVK8, **A**) and of a rat also treated with amlodipine during weeks 5 to 8 (+Amlo5-8, **B**). (**C**) Percentage of surface area occupied by collagen in the extracellular matrix in the non-calcified media (NM) and in calcified media (CM, inset) from each group. L: lumen. *P<0.05 versus non-calcified media of the same group.

Figure 4. (A) Representative autotracing of elastic lamellae from a warfarin and vitamin K₁-treated rat (WVK) by the mathematical algorithm described in the methods section. (B) Signal energy value of each elastic lamellae shown in panel A. (C) Undulation score in rats treated with WVK for 8 weeks alone or in combination with amlodipine from weeks 5 to 8 (+Amlo5-8). Signal energy of elastic lamellae in the normal media (NM) is also presented. *P<0.05 versus normal media, †P<0.05 versus WVK8.

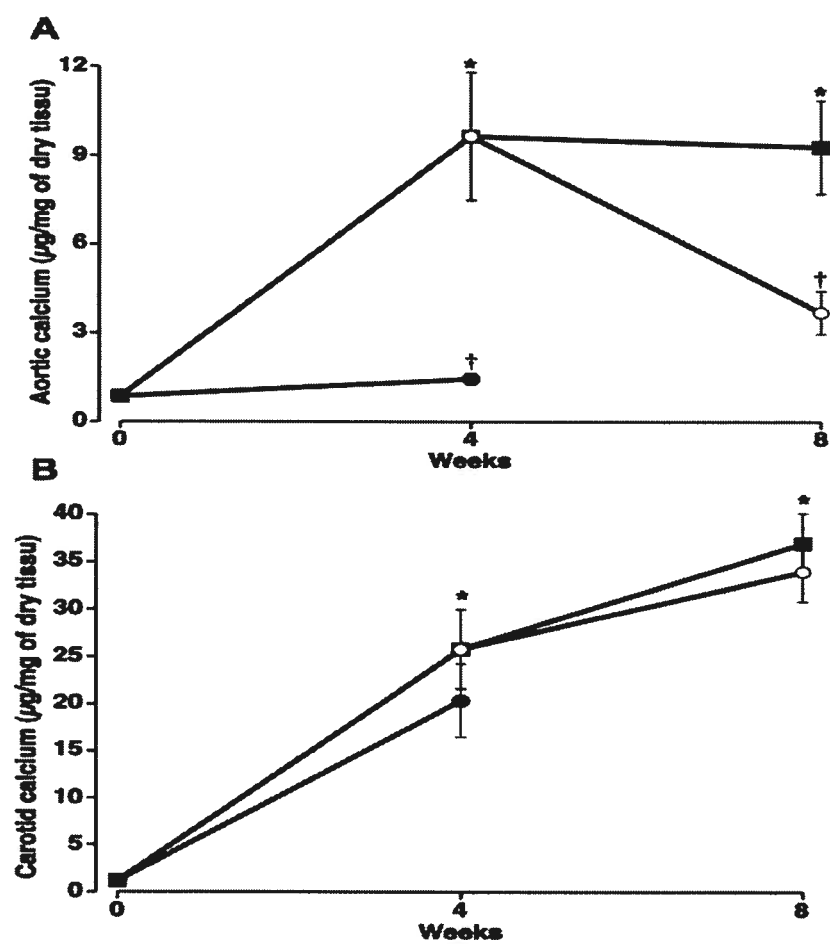
Figure 1 Essalihi et al

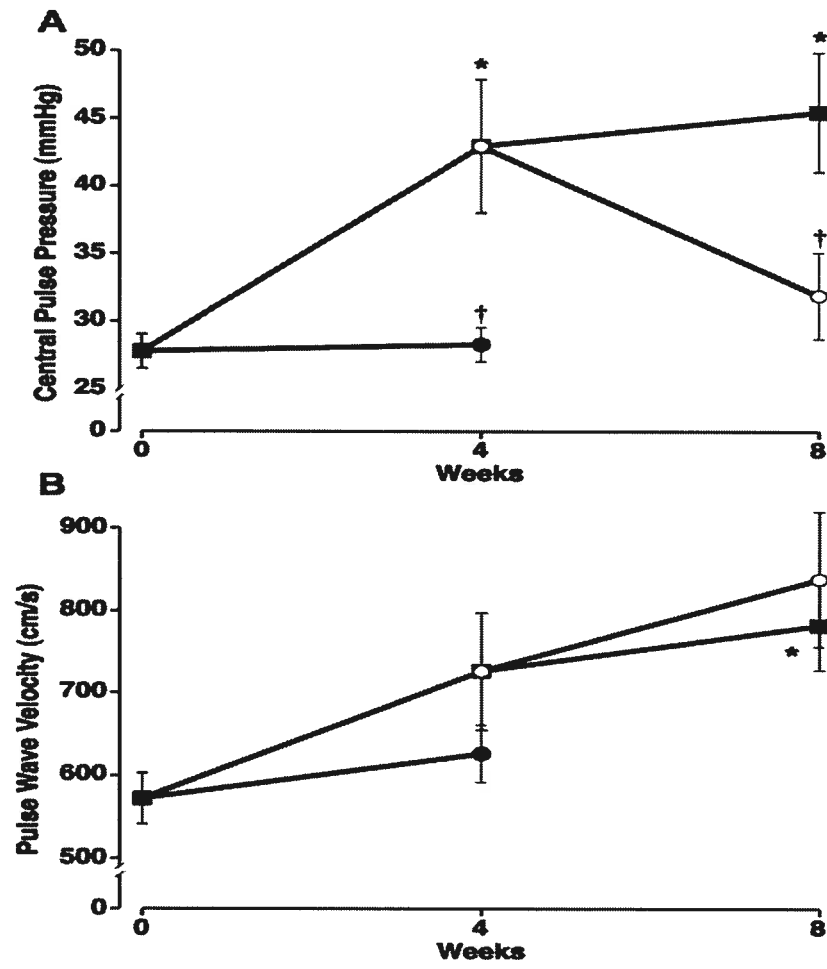
Figure 2 Essalihi et al

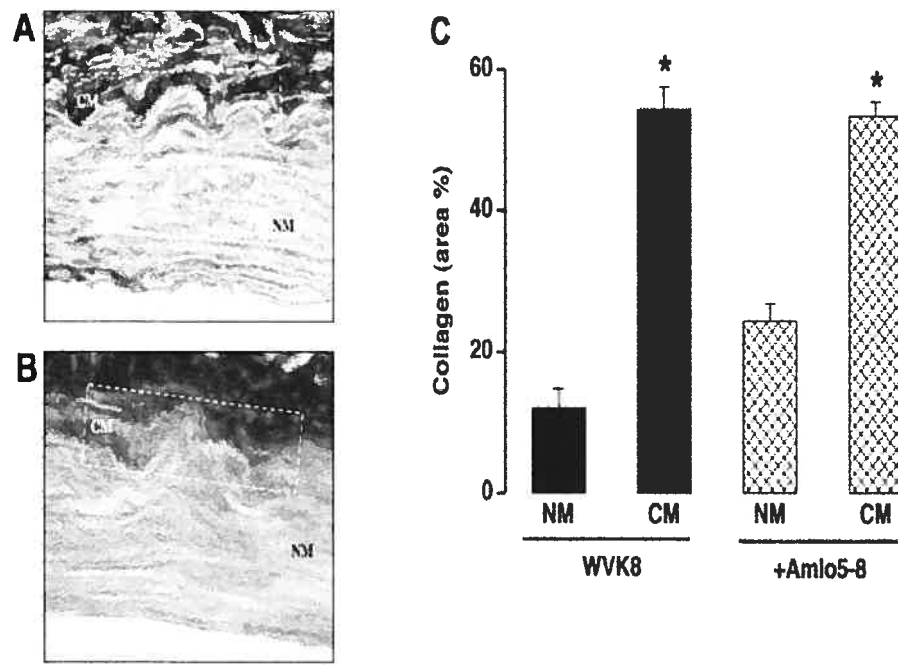
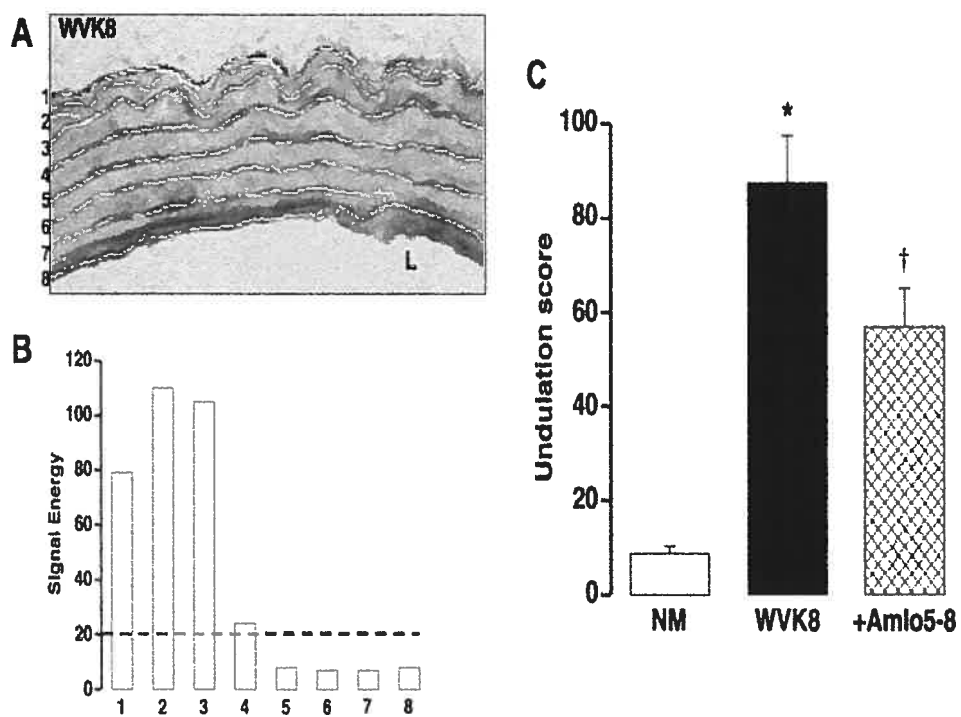
Figure 3 Essalihi et al

Figure 4 Essalihi et al



Chapitre 6. Discussion, conclusions générales et perspectives

6.1. Discussion

Actuellement, la majorité des antihypertenseurs sur le marché ont pour but de diminuer la résistance périphérique et/ou d'atténuer le débit cardiaque afin de réduire la pression artérielle moyenne (diastolique et systolique). Dans le cas de l'HSI, les PAD et PAM sont normales, tandis que la PAS et la PP sont très augmentées. L'élévation de la PAS et de la PP est principalement due à l'augmentation de la rigidité (fragmentation des filaments élastiques, élastocalcinose, augmentation du matériel rigide comme le collagène) des gros troncs comme l'aorte et non pas à une augmentation de la résistance périphérique. Ainsi, pour optimiser le traitement des patients atteints d'HSI, il serait préférable d'utiliser des agents pharmacologiques ciblant les facteurs qui augmentent la rigidité des grosses artères afin de réduire sélectivement la PAS et la PP [238]. Le but des travaux de cette thèse était tout d'abord de développer un modèle animal d'HSI induit par élastocalcinose. Puis, d'évaluer les effets de certains antihypertenseurs sur ce modèle afin de mieux comprendre comment on pourrait, dans l'avenir, traiter directement l'élastocalcinose et la rigidité des gros troncs.

Ainsi, les principaux résultats de cette thèse de doctorat ont été, premièrement, la mise au point et la caractérisation d'un modèle d'HSI chez le rat induit par un traitement chronique à la warfarine/vitamine K (WVK). Deuxièmement, nous avons montré que le darusantan, un ETRA, et l'amlodipine, un BCC, peuvent prévenir et régresser l'élastocalcinose et l'augmentation de la PP dans ce modèle d'HSI. De plus, nous avons

mis en évidence que la régression de l'élastocalcinose par le darusantan est dépendante de l'activation de l'anhydrase carbonique, une enzyme responsable de la résorption osseuse. Finalement, nous avons démontré que la régression de l'élastocalcinose par l'amolodipine n'est pas suffisante pour améliorer la compliance de l'aorte. En effet, il faudrait aussi tenir compte de la fibrose (dépôt de collagène) et du réarrangement de l'architecture des lamelles élastiques induit par l'élastocalcinose que l'amlodipine ne peut modifier.

6.1.1. Modèle expérimental d'hypertension systolique isolée chez le rat induit par une élastocalcinose

Tout d'abord, nous avons adapté un modèle de calcification artérielle médiale induit par un traitement chronique à la warfarine/vitamine K (WVK) décrit dans la littérature par le groupe du Dr. Price [232]. Cette adaptation avait pour but de rendre le modèle WVK plus intéressant en limitant l'inconfort de l'animal et le temps de traitement lui-même. Le modèle d'origine nécessitait des injections quotidiennes de warfarine (deux, une à 8h00 et l'autre à 20h00) et de vitamine K (une à 8h00). Nous avons limité les injections de vitamine K à trois par semaine et nous avons administré la warfarine dans l'eau de boisson. De surcroît, nous avons donné de la vitamine K en prétraitement d'une semaine permettant de diminuer le taux de mortalité à environ 5%, ce qui est très bien si on le compare avec celui de 17% des rats VDN (un autre modèle de calcification artérielle médiale) [239].

D'une part, l'évaluation hémodynamique de notre modèle WVK suggère qu'il représente un modèle reproductible et acceptable d'HSI. Ce modèle animal d'HSI possède

plusieurs caractéristiques similaires à celles retrouvées dans la forme humaine de la pathologie. En effet, une élévation de la PAS et de la PP est observée et ce sans changement significatif de la PAD et de la PAM [240]. D'autre part, plusieurs études [241, 242] tendent à montrer que le manque de MGP mature pourrait être impliqué dans la calcification artérielle médiale chez l'homme. Ainsi en bloquant la γ -carboxylation de la MGP dans notre modèle WVK, cela pourrait être physiopathologiquement relié à la calcification vasculaire humaine, rendant ce modèle attrayant pour étudier expérimentalement l'HSI.

a. Relation entre la calcification, la rigidité artérielle et l'hypertension systolique isolée

Dans notre modèle expérimental d'HSI, il semblerait que la calcification artérielle médiale induit une augmentation de la PP. D'ailleurs, le coefficient de corrélation entre la calcification aortique médiale et le PP suggère que 50% ($r^2 = 0.51$) de l'augmentation du PP est due à la calcification aortique médiale. De plus, après 4 semaines de traitement WVK on observe une élévation significative du PWV, un indice de rigidité aortique. Ainsi, la calcification aortique médiale semble augmenter la rigidité de l'aorte ce qui élève la PP. Ces données appuient celles du groupe du Dr. Atkinson, qui a fait des observations similaires dans le modèle de rats VDN [239]. Une association entre la calcification et la rigidité artérielle a aussi été suggérée chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique terminale [243]. En outre, il existe une corrélation positive entre l'âge et la rigidité de l'aorte parmi les patients avec de l'HSI [244]. Le vieillissement et certaines

pathologies comme l'insuffisance rénale chronique terminale et le diabète semblent donc contribuer au développement de l'HSI en favorisant la déposition graduelle de calcium sur les lamelles élastiques des artères de compliance [245]. Ainsi, les rats WVK représentent un bon modèle pour étudier la relation entre la calcification, la rigidité artérielles et la pression pulsée, et ce dans le but de trouver des thérapies anti-hypertensives capables de traiter l'élastocalcinose, d'améliorer la compliance des gros troncs et d'élucider leurs mécanismes.

En plus de l'élastocalcinose, la matrice extracellulaire (MEC) des rats WVK est aussi modifiée. Globalement, sur des coupes transversales d'aortes de rats traités avec de la WVK, la coloration pour l'élastine tend à diminuer et celle pour le collagène à augmenter, et ce spécialement à 8 semaines de traitement. Ces changements mènent à une élévation significative du rapport collagène/élastine (C/E), un autre facteur pouvant contribuer à l'augmentation de la rigidité artérielle. Toutefois, il est à noter que la calcification des lamelles élastiques peut avoir interférée avec la coloration de l'élastine. Il est donc intéressant de constater que des observations similaires ont été reportées chez les rats VDN, et ce en utilisant d'autres méthodes d'analyse [246]. On peut aussi affirmer que la calcification vasculaire affecte énormément l'architecture des lamelles élastiques (voir Figure 2 dans chapitre 2), suggérant une diminution de leur fonction physiologique. De plus, si on regarde plus spécifiquement dans les zones de calcification (Von Kossa positives), on peut remarquer une forte augmentation de la coloration pour le collagène, suggérant l'apparition d'une fibrose localisée. À ce propos, une étude a montré que le

collagène de type IV augmentait dans la tunique médiale d'aortes provenant de patients diabétiques comparativement à celles de patients non-diabétiques [247]. Par contre, le collagène de type V et total n'étaient pas modifiés significativement. Il serait alors intéressant de vérifier le type de collagène synthétisé dans les zones calcifiées.

b. Changements phénotypiques des cellules du muscle lisse vasculaire

L'analyse de coupes transversales d'aortes de rats WVK suggère que les CMLVs changent leur phénotype en présence d'une déposition de calcium. En effet, par immunohistochimie, on constate une diminution marquée de l' α -actine (un marqueur des CMLVs) entre les lamelles élastiques de zones calcifiées, et ce malgré la présence de cellules (confirmée par une coloration à l'hémaréine et éosine). D'ailleurs, Ahmed et al. ont montré une diminution similaire de l'expression de l'actine chez des patients en dialyse avec une artériolopathie calcifique et urémique [248].

Dans les souris déficientes en MGP, des chondrocytes ont pu être détectés dans les artères calcifiées [137]. Les chondrocytes sont des cellules normalement présentes dans le cartilage. Leur rôle est de produire les composantes de la MEC du cartilage, de participer à l'entretien du tissu cartilagineux et d'émettre des facteurs de croissance qui permettent aux fibroblastes de devenir des chondroblastes, cellules qui pourront de nouveau former du cartilage. De plus, des chercheurs ont observé que chez les souris déficientes en apolipoprotéine E (modèle d'athérosclérose), les cellules présentent dans les zones de calcification vasculaire exprimaient des protéines normalement exprimées par des

chondrocytes [249]. Toutefois, aucune évidence histologique n'a permis de détecter la présence de chondrocytes dans les artères calcifiées de notre modèle de rats WVK. Ceci s'expliquerait par des taux de calcification artérielle médiale beaucoup plus importants dans les souris $MGP^{-/-}$ que dans les rats WVK. D'ailleurs les souris $MGP^{-/-}$ meurent après seulement 2 mois suite à une dissection de l'aorte devenue très rigide [137].

L'absence de macrophages (détection d'ED-1 par immunohistochimie) dans notre modèle d'élastocalcinose corrèle bien avec la littérature. Effectivement, la plupart du temps, il est reporté que dans la calcification artérielle médiale on n'observe pas de lipides ou de cellules inflammatoires [250]. Cependant, un article récent du groupe du Dr. Atkinson montre la présence d'ED-1 dans les aortes calcifiées (au niveau de la tunique médiale) de rats VDN [216]. Cette différence pourrait s'expliquer par une calcification artérielle médiale plus intense chez les rats VDN ce qui entraînerait une réaction inflammatoire, mais cela reste à être vérifié.

Habituellement, l'ostéopontine (OPN) n'est pas exprimée dans des artères saines. Toutefois, plusieurs observations démontrent sa régulation à la hausse aux sites de calcification vasculaire. Ceci n'est pas seulement vrai chez les patients avec une artériolopathie calcifique urémique [248], mais aussi chez les insuffisants rénaux chronique [251] et les diabétiques [252]. Dans notre modèle WVK, on peut également observer une expression importante d'OPN dans les zones de calcification aortique médiale. Des études autant *in vitro*, qu'*in vivo* montrent que l'OPN peut non seulement inhiber la croissance du

cristal (hydroxyapatite) en se liant sur ses surfaces, mais aussi promouvoir la dissolution de ce dernier en favorisant l'acidification de la MEC et ce via des macrophages [219].

En résumé, tous ces changements phénotypiques tendent à montrer que les CMLVs dans les zones d'élastocalcinose réagissent à leur environnement qui change contribuant à la calcification ou encore à sa stabilisation, ce qui n'est toutefois pas bien encore défini.

c. Impact de l'hypertension systolique isolé expérimentale sur le système cardiovasculaire

Au niveau vasculaire, la structure globale de l'aorte ne semble pas être affectée. En effet, l'aire de section et le rapport média/lumière de l'aorte sont inchangés suite au traitement WVK, suggérant que la PP n'influence pas l'hypertrophie ou le remodelage des grosses artères. Ceci pourrait s'expliquer par la loi de Laplace où la tension pariétale = $(PAM \times DI) / (2 \times \text{média})$. Comme la PAM n'est pas modifiée, on ne s'attend pas à ce que le diamètre interne ou l'épaisseur de la média changent, à moins que la PP ait un impact direct sur la remodelage. Chez les patients atteints d'HSI, des augmentations du rapport média/lumière et de l'aire de section sont souvent observées, mais surtout en raison d'une prolifération intimale et de l'athérosclérose [253]. Cette différence entre notre modèle d'HSI et la pathologie humaine pourrait s'expliquer par le fait que les rats développent que très rarement une hyperplasie néointimale. De plus, dans notre modèle, la calcification de l'aorte est très rapide (atteinte du maximum en 4 semaines) par rapport au développement de la maladie chez l'homme, surtout dans un contexte de vieillissement. Ainsi, cette

calcification rapide pourrait inhiber la capacité du vaisseau à se remodeler. En outre, il est possible de croire que certains patients peuvent développer une hypertension systolo-diastolique qui devient systolique isolée suite à l'augmentation de la rigidité de l'aorte. Or l'hypertension systolo-diastolique induit un remodelage aortique [254], qui est irréversible (sans traitement approprié) et donc ces patients présenteront une HSI associée à un remodelage.

La vasoconstriction et la relaxation qui dépendent de l'endothélium ont aussi été évaluées sachant qu'elles peuvent avoir un effet sur la compliance vasculaire [53]. Le traitement WVK chez les rats n'a pas affecté la vasoréactivité de l'aorte, suggérant qu'il est peu probable que l'augmentation de la rigidité aortique (mesurée par la vitesse de l'onde de pouls) soit causée par une modification de sa réactivité. Pour évaluer l'impact de la PP sur le système sympathique et celui de la rénine angiotensine, nous avons mesuré les taux de catécholamines et l'activité de la rénine dans le plasma. Ces indices globaux n'ont pas été augmentés, au contraire, l'activité de la rénine a même diminué significativement, appuyant que l'augmentation de la rigidité artérielle n'est pas due à une augmentation de la réactivité vasculaire dans notre modèle. Ces résultats suggèrent aussi que la PP ne mène pas à une dysfonction endothéliale, contrairement à ce qui est observé dans la plupart des modèles d'hypertension essentielle [255] et chez les rats âgés [256]

Au niveau cardiaque, le traitement WVK n'a pas induit une hypertrophie du ventricule gauche et l'aire du ventricule gauche ainsi que son épaisseur n'ont pas été

modifiés. Ces résultats vont à l'encontre d'un rôle de la PAS sur le remodelage cardiaque. Chez les rats VDN, une corrélation a été établie entre la rigidité artérielle (donc une augmentation de la PP) et une hypertrophie cardiaque. Cette corrélation a été rapportée après 3 mois de traitement [257], il se peut donc que les 8 semaines de WVK n'ont pas été suffisantes pour observer l'impact de l'augmentation de la rigidité artérielle sur le cœur. De plus, contrairement aux rats WVK, chez les rats VDN, on observe une calcification cardiaque et une bradycardie [257] pouvant contribuer à une hypertrophie du cœur afin de normaliser sa fonction. Une étude chez des adultes normotendus, avec une hypertension systolo-diastolique ou une HSI a montré qu'il y avait une élévation généralisée de l'indice de la masse ventriculaire gauche chez tous les hypertendus [258]. Mais encore une fois, les antécédents d'hypertension systolo-diastolique de ces patients ne sont pas clarifiés. Une autre étude montre que la réduction de l'amplification de la PP de l'aorte (central) vers les artères périphériques peut contribuer à l'augmentation de la post-charge cardiaque et ainsi induire une hypertrophie cardiaque [259]. Dans notre modèle de rats WVK, l'amplification de la PP (du centre vers les périphéries) est maintenue pouvant peut-être minimiser l'impact hémodynamique sur le cœur.

6.1.2. Effets du darusantan et de l'amlodipine sur l'élastocalcinose

a. Prévention de l'élastocalcinose aortique

Autant le darusantan (ETRA) [33] que l'amlodipine (BCC) ont permis de prévenir l'élastocalcinose induite par 4 semaines de traitement WVK. D'ailleurs plusieurs études

montrent que la calcification artérielle médiale peut être prévenue par diverses molécules comme les diurétiques [33], les antagonistes du récepteur AT_1 de l'ang II [33], d'autres BCC (vérapamil) [260] et les agonistes des PPAR gamma [216]. Ces études utilisaient le modèle de rats WVK ou VDN. Le ou les mécanismes par lesquels ces drogues peuvent prévenir les dépôts de cristaux d'hydroxyapatite sur les lamelles élastiques de l'aorte n'est pas encore bien défini. Toutefois, sachant que la résorption osseuse et la calcification vasculaire semblent être deux processus reliés, cela peut représenter un indice sur un mécanisme de prévention. À ce propos, une étude menée sur une période de 25 ans, montre que les femmes ayant subi la plus grande perte osseuse démontrent également la plus sévère progression de la calcification aortique abdominale [221]. De plus, des biphosphonates, à des doses reconnues pour inhiber la résorption osseuse, ont permis de prévenir la calcification artérielle médiale chez des rats WVK [217], suggérant encore une fois que la résorption osseuse semble influencer la calcification vasculaire. Comme les biphosphonates ne diminuent pas significativement les taux plasmatiques de calcium et de phosphate, le groupe du Dr. Price a émis l'hypothèse que la calcification artérielle pourrait être induite par la génération de noyaux de cristaux aux sites de résorption osseuse qui voyageraient dans le sang et se logeraient dans la paroi artérielle [217].

Plusieurs études montrent que les effets des BCC ne se limitent pas au système cardiovasculaire, mais peuvent aussi affecter le métabolisme du calcium au niveau des os, et ce à cause de la présence de canaux calciques voltage dépendant de type L sur les cellules osseuses [261]. Des chercheurs ont démontré que l'amlodipine peut réduire la

résorption osseuse basale et celle induite par l'hormone parathyroïdienne dans un modèle *in vitro* [262], appuyant l'hypothèse que l'amlodipine prévient en partie l'élastocalcinose par l'inhibition de la résorption osseuse. Par contre, comme l'ET inhibe la résorption osseuse [263], il serait difficile de croire qu'un antagoniste des récepteurs de l'ET prévient l'élastocalcinose via la résorption osseuse. Ainsi, il sera important dans le futur de considérer d'autres avenues que l'inhibition de la résorption osseuse comme mécanisme de la prévention de la calcification vasculaire.

b. Régression de l'élastocalcinose aortique

Tout d'abord, il est intéressant de noter que dans notre modèle WVK, on atteint une calcification aortique maximale à 4 semaines de traitement, mais pas au niveau des carotides, où la calcification continue d'augmenter. Ainsi, le contenu aortique en calcium à 8 semaines est équivalent à celui à 4 semaines. Il est alors facile d'établir le protocole d'une véritable régression de la calcification aortique en donnant le traitement souhaité à partir de la quatrième semaine de WVK.

La calcification des tissus mous a longtemps été considérée comme un phénomène irréversible, même si on peut la prévenir. Toutefois, deux de nos études ont montré que le darusantan et l'amlodipine induisent une régression de l'élastocalcinose dans l'aorte. De plus, une étude a démontré que des valves aortiques synthétiques (GFAV) introduites dans des souris OPN^{-/-} calcifiaient 4 à 5 fois plus et de manière accélérée comparativement à celles introduites dans des souris sauvages [219], suggérant que l'OPN endogène inhibe

normalement la calcification ectopique. De manière surprenante, chez les souris hétérozygotes, une régression de la calcification des GFAV fut observée dans le temps. La liaison de l'OPN aux cristaux d'hydroxyapatite permettrait l'accumulation de macrophages et de cellules géantes (multi nucléées) aux sites d'implantation des prothèses, la régulation à la hausse de l'AC II, et l'acidification du milieu environnant, contribuant à la dissolution des minéraux sur les GFAV. En accord avec cette étude, nous avons montré que dans notre modèle WVK, il y avait expression de l'OPN aux sites de calcification et que l'AC II y était présente de manière plus abondante. A priori on peut observer des similitudes entre ces deux types de tissus cardiovasculaires calcifiés. Par contre, dans notre modèle WVK, aucun macrophage n'a été détecté dans la paroi aortique tel que mesuré par immunohistochimie de ED-1. De plus, même si l'OPN et l'AC II sont surexprimés dans les zones calcifiées, ils ne permettent pas une régression spontanée efficace de la calcification comme démontré par nos groupes placebo (traitement WVK pendant 4 semaines, puis arrêt du traitement pour 4 ou 18 semaines). Il semblerait donc que l'OPN et l'AC II permettent de limiter la calcification sans toutefois pouvoir la renverser efficacement dans notre modèle WVK. Par contre, lorsque l'on donne de l'acétazolamide, un inhibiteur non spécifique de l'AC II, la calcification artérielle médiale n'est pas amplifiée, suggérant que l'OPN peut alors compenser pour l'inhibition de l'AC II.

i. Mécanisme de régression de l'élastocalcinose aortique par le darusantan

Lors de notre étude sur le darusantan, nous avons fait la découverte surprenante que l'activité et l'expression d'une forme membranaire de l'AC (AC IV) était fortement

augmentée après une semaine de traitement avec le darusantan chez les rats WVK. Contrairement à l'expression l'AC II, celle de l'AC IV n'est pas augmentée par l'élastocalcinose. Par contre, on observe une élévation transitoire de l'AC IV lors du blocage des récepteurs de l'ET. Cette observation a été confirmée autant par immunohistochimie, immunobuvardage que par la mesure directe de l'activité de l'isoenzyme dans l'aorte. De plus, la surexpression transitoire de l'AC IV ne se limite pas aux zones calcifiées mais elle se retrouve dans l'ensemble de la paroi aortique tel que vu par immunohistochimie (voir Figure 2 dans chapitre 4). L'administration chronique d'acétozolamide en même temps que le darusantan bloque la régression de l'élastocalcinose aortique, confirmant le rôle crucial que joue l'AC. Il aurait toutefois été intéressant d'avoir un inhibiteur spécifique de l'AC IV, pour confirmer l'importance de cet isoenzyme. Par contre, il n'est pas exclu que l'AC II et IV coopèrent afin de régesser l'élastocalcinose aortique. Si l'on regarde ce qui se passe au niveau de la résorption osseuse (acidification de la MEC osseuse pour dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite), et sachant que les isoformes de l'AC catalysent l'hydratation du CO_2 , produisant une grande quantité de protons, il est tentant d'émettre l'hypothèse que la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite dans la paroi aortique est possible grâce à l'acidification de la MEC. Par contre, nous n'avons aucune preuve directe de la diminution du pH dans la MEC pour supporter cette hypothèse. Globalement, il semblerait donc que l'inhibition du système de l'ET permet l'expression de l'AC IV, ce qui contribue à la régression de la calcification

aortique médiale. Toutefois, les liens (voie de signalisation, etc) unissant l'ET et les isoformes de l'AC sont actuellement inconnus.

ii. Mécanisme de régression de l'élastocalcinose aortique par l'amlodipine

Tout comme le darusantan, l'amlodipine a permis de régresser significativement l'élastocalcinose aortique. D'ailleurs une autre étude a montré que le vérapamil, un autre BCC, permet de régresser la calcification des coronaires observée dans le modèle de rats VDN [218]. Malgré la différence physiopathologique entre les modèles WVK et VDN, il semblerait que les canaux calciques jouent un rôle important dans le processus de calcification indépendamment de sa cause (inhibition d'une protéine anti-calcifiante ou surcharge calcique).

Le mécanisme précis par lequel l'amlodipine permet la régression de la calcification aortique médiale n'a pas été investigué. Toutefois, certaines études montrent que des BCCs induisent une diminution de l'expression de l'ARNm de l'ET [264] et bloquent certains effets de l'ET. Effectivement, plusieurs effets de l'ET sont induits via les canaux calciques. Il est alors probable que l'amlodipine régresse l'élastocalcinose aortique via le blocage du système de l'ET, qui permet d'induire l'expression transitoire de l'AC IV. Cette hypothèse reste toutefois à être démontrée.

c. Effets des antihypertenseurs sur l'élastocalcinose dans les carotides

Comparativement à ce qui se passe dans l'aorte, le traitement WVK induit une calcification exagérée dans les carotides (2 à 3 fois plus que dans l'aorte). Une analyse par coloration von Kossa et par Micro-CT nous permet bien de visualiser cet état de fait (voir Figure 6 dans chapitre 4). De plus, le contenu en calcium dans les carotides n'atteint pas un plateau après 4 semaines de WVK, il continue d'augmenter. Le darusantan et l'amlodipine ne préviennent ni ne régressent l'élastocalcinose dans les carotides. Pour expliquer cette hétérogénéité de réponse entre ces deux segments de l'arbre artériel, on peut remarquer la différence d'expression de l'anhydrase carbonique II et IV dans le temps. En effet, dans les zones calcifiées de l'aorte (dans la tunique médiale), l'expression de l'anhydrase carbonique II induite augmente, mais pas dans les carotides (voir Figure 1 dans chapitre 4). Ceci pourrait expliquer pourquoi on n'atteint pas un plateau de calcification dans les carotides, en supposant que l'anhydrase carbonique II peut limiter l'élastocalcinose. De plus, dans le protocole de régression, on remarque que le darusantan induit une forte expression de l'anhydrase carbonique IV dans toute la tunique médiale de l'aorte et ce seulement après une semaine de traitement. Cependant, dans les carotides, cette surexpression de l'anhydrase carbonique IV est retardée, n'apparaissant qu'après 4 semaines d'administration de darusantan (voir Figure 2 dans chapitre 4). Il aurait donc été intéressant de prolonger les temps de traitement afin de voir si la prévention ou la régression de l'élastocalcinose dans les carotides auraient été possible.

D'autre part, lors du développement, l'aorte thoracique et les carotides ont une origine différente. Les carotides proviennent de l'ectoderme alors que l'aorte thoracique dérive du mésoderme [265]. Cette différence d'origine pourrait avoir un impact sur la capacité des cellules vasculaires à répondre à un changement de leur environnement. Nous n'avons toutefois pas d'explication définitive tant qu'aux différences observées entre l'aorte et les carotides.

6.1.3. Impact du darusantan et de l'amlodipine sur les paramètres hémodynamiques et la rigidité artérielle

Comme mentionné précédemment, l'élastocalcinoïse induite par le traitement WVK engendre une augmentation de la rigidité de l'aorte (mesuré par le PWV) et par conséquent de la PP. Il serait alors logique de croire que seule la régression de l'élastocalcinoïse permettrait une diminution de la PP. Le coefficient de corrélation entre la calcification aortique médiale et la PP semble indiquer que seulement 50% des changements de la PP est dû à la calcification. En effet, d'autres facteurs comme l'éjection ventriculaire, l'onde de réflexion, la contraction des CMLVs, la fragmentation de l'élastine et le contenu en collagène influencent tous la PP. À cet effet, les ondes de réflexion sont très importantes dans la détermination de la morphologie du contour de l'onde systolique, de la pression maximale en systole dans l'aorte et de la post-charge cardiaque [266]. La vitesse des ondes de réflexion, qui favorise sa superposition à l'onde incidente (qui va du cœur vers les périphéries) déterminant la PP, est influencée par la résistance périphérique [267]. Le

darusantan et l'amlodipine ont permis de régresser l'élastocalcinose aortique, mais pas l'acétazolamide. Toutefois les 3 médicaments ont normalisé la PP. L'effet vasodilatateur de l'acétazolamide permettrait à l'onde de réflexion de revenir en diastole et non plus en systole comme c'est le cas lorsque les gros troncs deviennent plus rigides. Cela normaliserait alors la PP et ce, sans changer le PWV. Dans notre dernière étude, l'amlodipine permet également de normaliser la PP sans changer le PWV. Une étude chez des patients avec une hypertension essentielle moyenne à modérée montre que le quinapril (IECA), l'amlodipine (BCC) et le losartan (antagoniste du récepteur AT_1 de l'ang II) permettent tous de diminuer la pression artérielle (incluant la PP), mais seul le quinapril diminue le PWV [268].

Malgré le fait que l'amlodipine régresse la calcification aortique médiale, cette molécule n'a aucun impact sur la rigidité de l'aorte (mesuré par le PWV). Afin d'élucider cette contradiction, nous avons étudié le contenu en collagène, et ce spécifiquement dans les zones calcifiées de la média de l'aorte, en assumant que l'élastocalcinose pourrait engendrer une réponse fibrotique qui elle ne serait pas réversible par le traitement. La quantification de la déposition de collagène par la coloration au rouge Sirius démontre clairement une fibrose dans les zones calcifiées, et l'amlodipine n'a aucun impact sur cette dernière. Nos résultats concordent avec des études qui montrent que l'amlodipine ne peut renverser la fibrose du myocarde chez des patients hypertendus [269]. De plus, l'amlodipine permettrait même l'augmentation des ponts intermoléculaires entre les molécules de collagène, favorisant la fibrose [270]. Contrairement à ce qu'on observe dans

notre modèle de rats WVK, chez les rats VDN, aucune fibrose n'a été reportée [216]. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la quantification du collagène chez les rats VDN s'est faite par la quantification de l'hydroxyproline dans une section d'aorte thoracique. Donc, si comme dans notre modèle la fibrose se produit spécifiquement dans les zones calcifiées, il se peut que le résultat ait été « dilué ». D'ailleurs, dans la première étude de cette thèse, nous n'avons pas trouvé de différence significative de collagène entre les rats témoins et WVK, car à l'époque nous ne quantifions pas le collagène spécifiquement dans les zones calcifiées, mais dans l'ensemble de la tunique médiale de l'aorte.

Nous avons aussi établi une note d'ondulation (*undulation score*, US) représentant un indice de la distorsion des lamelles élastiques dans le but de prouver qu'après la régression de l'élastocalcinose par l'amlodipine, les lamelles élastiques ne retrouvaient pas totalement leur architecture initiale et fonctionnelle. Le US des rats WVK traités avec de l'amlodipine pendant les 4 dernières semaines est significativement plus élevé que celui des rats témoins. Toutefois, la réduction partielle mais significative du US par rapport aux rats WVK pourrait être attribuable à la décalcification des lamelles élastiques. Cette réduction ne serait par contre pas assez importante pour qu'il puisse y avoir un effet sur le PWV.

Malheureusement, nous n'avons pas les mesures du PWV pour l'étude avec le darusantan, car à l'époque cette méthode n'était pas mise au point au laboratoire.

6.2. Conclusion générale et perspective

Dans l'ensemble, les travaux de ma thèse ont permis de mettre au point un nouveau modèle expérimental d'HSI chez le rat basé sur l'inactivation de la MGP par un traitement chronique à la warfarine. Ce modèle possède d'ailleurs plusieurs caractéristiques retrouvées chez la pathologie humaine, c'est-à-dire calcification artérielle médiale, élévation sélective de la PAS et du PP ainsi que du PWV, un indice de rigidité artérielle. De plus, la régression de l'élastocalcinose induite par le darusantan, un antagoniste des récepteurs de l'endothéline, dépend de l'activation d'une forme membranaire de l'AC, suggérant des changements locaux de pH afin de dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite présents sur les lamelles élastiques dans la paroi aortique. Par contre, grâce à l'étude avec l'amlodipine, on a pu constater que la régression de l'élastocalcinose n'est pas suffisante pour améliorer la compliance aortique, suggérant qu'il faut également tenir compte de la fibrose qui se développe dans les zones calcifiées. Une fois la fibrose installée, il est difficile de la régresser, c'est pourquoi il serait intéressant d'agir pendant son développement pour de meilleurs résultats. En clinique il n'est toutefois pas évident de donner une médication à des patients qui n'ont pas encore développé totalement une pathologie.

Dans l'avenir, ce modèle pourra donc être très utile afin de trouver de nouveaux outils pharmacologiques capables de réduire directement la rigidité des gros troncs en s'attaquant autant à l'élastocalcinose qu'à la fibrose, et ce afin de diminuer spécifiquement

la PAS et le PP. Bref, il est crucial de trouver un traitement efficace à l'HSI qui actuellement n'est pas traité de manière optimale.

Références

1. Grégoire I, Achard J-M, Tribout B, Fournier A, *Physiopathologie de l'hypertension artérielle essentielle*, in *Néphrologie: Hypertension artérielle*. 1992, Hermann, éditeur des sciences et des arts: Paris. p. 87-113.
2. Safar ME, Boudier HS. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. *Hypertension* 2005; 46:205-9.
3. The pooling project research group. Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: final report of the pooling project. . *J Chronic Dis* 1978; 31:201-306.
4. Kannel WB, Gordon T, Schwartz MJ. Systolic versus diastolic blood pressure and risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Am J Cardiol* 1971; 27:335-46.
5. The fifth report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC V). *Arch Intern Med* 1993; 153:154-83.
6. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 1997; 157:2413-46.
7. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003; 42:1206-52.
8. Drouin D, Milot A, ed. *Hypertension artérielle 2002: Guide thérapeutique de la Société québécoise d'hypertension artérielle*. 2002.
9. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, *Human Physiology: The mechanisms of body function*. Fifth ed. 1990, McGraw-Hill Publishing Company.
10. Berne R, Levy M, *The cardiac pump*, in *Cardiovascular physiology*. 1997, Mosby: p. 55-81.
11. Berne R, Levy M, *Hemodynamics*, in *Cardiovascular physiology*, Mosby, Editor. 1997, Mosby: p. 113-133.

12. Mulvany M, *Remodeling of resistance vessels in essential hypertension*, in *Hypertension: A companion to Brenner and Rector's The Kidney*. 2000, W.B. Saunders Company: p. 125-134.
13. Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 1989; 13:968-72.
14. Girerd X, Giannattasio C, Moulin C, Safar M, Mancia G, Laurent S. Regression of radial artery wall hypertrophy and improvement of carotid artery compliance after long-term antihypertensive treatment in elderly patients. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1064-73.
15. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1998; 16:457-66.
16. Alderman MH, *Target Organ Damage/Cardiovascular Complications*, in *Hypertension: A companion to Brenner and Rector's The Kidney*. 2000, W.B. Saunders Company: p. 221-227.
17. Puschett JB, *Diuretics*, in *Hypertension Primer The essentials of high blood pressure*. 1999, Lippincott William & Wilkins: p. 358-361.
18. Andrejak M, Achard J-M, Fournier A, *Pharmacologie des antihypertenseurs*, in *Néphrologie: Hypertension artérielle*. 1992, Hermann, éditeur des sciences et des arts: Paris. p. 457-496.
19. Diuretic versus alpha-blocker as first-step antihypertensive therapy: final results from the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Hypertension* 2003; 42:239-46.
20. Rahman M, Wright J, *alpha,beta-Adrenergic Blockers*, in *Hypertension Primer The essentials of high blood pressure*. 1999, Lippincott William & Wilkins: p. 368-369.
21. Sica DA, Ripley E, *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors*, in *Hypertension Primer The essentials of high blood pressure*. 1999, Lippincott William & Wilkins: p. 372-376.
22. Weber MA, *Angiotensin II Receptor Blockers*, in *Hypertension Primer The essentials of high blood pressure*. 1999, Lippincott William & Wilkins: p. 377-378.
23. Weir MR, *Dihydropyridine Calcium Antagonists*, in *Hypertension Primer The essentials of high blood pressure*. 1999, Lippincott William & Wilkins: p. 379-381.

24. Levine TB, Sica D, *Non-dihydropyridine Calcium Antagonists*, in *Hypertension Primer The essentials of high blood pressure*. 1999, Lippincott William & Wilkins: p. 382-384.
25. Ram CVS, *Direct Vasodilators*, in *Hypertension Primer The essentials of high blood pressure*. 1999, Lippincott William & Wilkins: p. 385-387.
26. Staessen J, Amery A, Fagard R. Isolated systolic hypertension in the elderly. *J Hypertens* 1990; 8:393-405.
27. Swales JD. Current status of hypertensive disease treatment: results from the Evaluation and Interventions for Systolic Blood pressure Elevation: Regional and Global (EISBERG) project. *J Hypertens Suppl* 1999; 17:S15-9.
28. Fagard RH, Van den Enden M. Treatment and blood pressure control in isolated systolic hypertension vs diastolic hypertension in primary care. *J Hum Hypertens* 2003; 17:681-7.
29. Thijs L, Den Hond E, Nawrot T, Staessen JA. Prevalence, pathophysiology and treatment of isolated systolic hypertension in the elderly. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2:761-9.
30. Safar ME, Laurent P. Pulse pressure and arterial stiffness in rats: comparison with humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H1363-9.
31. Rutan GH, Kuller LH, Neaton JD, Wentworth DN, McDonald RH, Smith WM. Mortality associated with diastolic hypertension and isolated systolic hypertension among men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Circulation* 1988; 77:504-14.
32. Benetos A, Safar M, Rudnichi A, Smulyan H, Richard JL, Ducimetieere P, et al. Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension* 1997; 30:1410-5.
33. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2002; 20:1597-606.
34. Pini R, Cavallini MC, Bencini F, Silvestrini G, Tonon E, De Alfieri W, et al. Cardiovascular remodeling is greater in isolated systolic hypertension than in diastolic hypertension in older adults: the Insufficienza Cardiaca negli Anziani Residenti (ICARE) a Dicomano Study. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1283-9.

35. Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart Disease? The Framingham heart study. *Circulation* 1999; 100:354-60.
36. SHEP Cooperative Research Group. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). SHEP Cooperative Research Group. *Jama* 1991; 265:3255-64.
37. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhager WH, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet* 1997; 350:757-64.
38. Liu L, Wang JG, Gong L, Liu G, Staessen JA. Comparison of active treatment and placebo in older Chinese patients with isolated systolic hypertension. Systolic Hypertension in China (Syst-China) Collaborative Group. *J Hypertens* 1998; 16:1823-9.
39. Kjeldsen SE, Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Aurup P, Edelman J, et al. Effects of losartan on cardiovascular morbidity and mortality in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy: a Losartan Intervention for Endpoint Reduction (LIFE) substudy. *Jama* 2002; 288:1491-8.
40. Shorr RI, Somes GW. Can Diastolic Blood Pressure be Excessively Lowered in the Treatment of Isolated Systolic Hypertension? *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2000; 2:134-137.
41. Waeber B. Trials in isolated systolic hypertension: an update. *Curr Cardiol Rep* 2003; 5:427-34.
42. O'Rourke MF, Hayward CS, Lehmann ED, *Arterial Stiffness*, in *Hypertension: A companion to Brenner and Rector's The Kidney*. 2000, W.B. Saunders Company: p. 134-151.
43. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 2005; 66:307-17.
44. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003; 57:195-202.

45. Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 1977; 11:323-44.
46. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
47. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-6.
48. Tesfamariam B, Jakubowski JA, Cohen RA. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂. *Am J Physiol* 1989; 257:H1327-33.
49. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-5.
50. Fitch RM, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX. Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc Res* 2001; 51:351-8.
51. Boutouyrie P, Bezie Y, Lacolley P, Challande P, Chamiot-Clerc P, Benetos A, et al. In vivo/in vitro comparison of rat abdominal aorta wall viscosity. Influence of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1346-55.
52. Kals J, Kampus P, Kals M, Pulges A, Teesalu R, Zilmer M. Effects of stimulation of nitric oxide synthesis on large artery stiffness in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2005.
53. Wilkinson IB, Franklin SS, Cockcroft JR. Nitric oxide and the regulation of large artery stiffness: from physiology to pharmacology. *Hypertension* 2004; 44:112-6.
54. Heintz B, Dorr R, Gillessen T, Walkenhorst F, Krebs W, Hanrath P, et al. Do arterial endothelin 1 levels affect local arterial stiffness? *Am Heart J* 1993; 126:987-9.
55. Cosentino F, Luscher TF. Effects of blood pressure and glucose on endothelial function. *Curr Hypertens Rep* 2001; 3:79-88.
56. Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF, O'Brien RF. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236:339-43.

57. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; 248:C550-6.
58. Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. *Faseb J* 1991; 5:2713-20.
59. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989; 264:14954-9.
60. Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Masaki T. Analysis of endothelin related peptides in culture supernatant of porcine aortic endothelial cells: evidence for biosynthetic pathway of endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162:1287-94.
61. Dousset B, Jacob C, Huu TC, Kessler M. [Endothelin and kidney]. *Nephrologie* 1993; 14:9-17.
62. Brillet G, Deray G, Habib AM, Martinez F, Jacobs C. [Renal effects of endothelins]. *Nephrologie* 1993; 14:129-32.
63. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, et al. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem* 1992; 267:18797-804.
64. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178:656-63.
65. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; 268:19126-33.
66. Chow LH, Subramanian S, Nuovo GJ, Miller F, Nord EP. Endothelin receptor mRNA expression in renal medulla identified by in situ RT-PCR. *Am J Physiol* 1995; 269:F449-57.
67. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005; 43:19-29.
68. Chatziantoniou C, Dussaule JC. Endothelin and renal vascular fibrosis: of mice and men. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9:31-6.

69. Rockey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest* 1996; 98:1381-8.
70. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J* 1990; 4:2989-3000.
71. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, et al. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:3915-8.
72. Resink TJ, Scott-Burden T, Buhler FR. Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* 1990; 189:415-21.
73. Liu Y, Geisbuhler B, Jones AW. Activation of multiple mechanisms including phospholipase D by endothelin-1 in rat aorta. *Am J Physiol* 1992; 262:C941-9.
74. Griendling KK, Tsuda T, Alexander RW. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989; 264:8237-40.
75. Simonson MS, Wang Y, Jones JM, Dunn MJ. Protein kinase C regulates activation of mitogen-activated protein kinase and induction of proto-oncogene c-fos by endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 Suppl 12:S29-32.
76. Simonson MS. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev* 1993; 73:375-411.
77. Nord EP. Role of endothelin in acute renal failure. *Blood Purif* 1997; 15:273-85.
78. Fleming T, Lindenfeld J, Lipicky R, Armstrong P. Report from the 93rd Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee Meeting, August 9-10, 2001. *Circulation* 2001; 104:1742.
79. Cantini C, Kieffer P, Corman B, Liminana P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats. *Hypertension* 2001; 38:943-8.
80. Ferrari AU, Radaelli A, Centola M. Invited review: aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol* 2003; 95:2591-7.

81. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation* 2003; 107:490-7.
82. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 2005; 66:286-94.
83. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993; 88:77-81.
84. Hatake K, Kakishita E, Wakabayashi I, Sakiyama N, Hishida S. Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin. *Stroke* 1990; 21:1039-43.
85. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, et al. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 1995; 91:1981-7.
86. Lyons D, Roy S, Patel M, Benjamin N, Swift CG. Impaired nitric oxide-mediated vasodilatation and total body nitric oxide production in healthy old age. *Clin Sci (Lond)* 1997; 93:519-25.
87. Singh N, Prasad S, Singer DR, MacAllister RJ. Ageing is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in the human forearm. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102:595-600.
88. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-4.
89. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, et al. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 2002; 90:1159-66.
90. Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Luscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 1997; 30:817-24.
91. Tanabe T, Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, et al. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta Physiol Scand* 2003; 178:3-10.

92. Buys CH. Telomeres, telomerase, and cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:1282-3.
93. Cliff WJ. The aortic tunica media in aging rats. *Exp Mol Pathol* 1970; 13:172-89.
94. Fornieri C, Quaglino D, Jr., Mori G. Role of the extracellular matrix in age-related modifications of the rat aorta. Ultrastructural, morphometric, and enzymatic evaluations. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:1008-16.
95. Gaballa MA, Jacob CT, Raya TE, Liu J, Simon B, Goldman S. Large artery remodeling during aging: biaxial passive and active stiffness. *Hypertension* 1998; 32:437-43.
96. Cattell MA, Anderson JC, Hasleton PS. Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clin Chim Acta* 1996; 245:73-84.
97. Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* 2001; 122:735-55.
98. Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *Faseb J* 1992; 6:2439-49.
99. Maillard L, Gautier M. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *C R Seances Acad Sci III* 1912; 154:66-68.
100. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:1-21.
101. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318:1315-21.
102. Paul RG, Bailey AJ. The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:653-60.
103. Bruel A, Oxlund H. Changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation endproducts of the rat aorta in relation to age. *Atherosclerosis* 1996; 127:155-65.
104. Corman B, Duriez M, Poitevin P, Heudes D, Bruneval P, Tedgui A, et al. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:1301-6.

105. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroot RC, et al. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* 2001; 104:1464-70.
106. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens* 2003; 21:3-12.
107. Watanabe M, Sawai T, Nagura H, Suyama K. Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta. *Tohoku J Exp Med* 1996; 180:115-30.
108. Atkinson J. [Aging of arterial extracellular matrix elastin: etiology and consequences]. *Pathol Biol (Paris)* 1998; 46:555-9.
109. Lansman JB. Endothelial mechanosensors. Going with the flow. *Nature* 1988; 331:481-2.
110. Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993; 260:1124-7.
111. Siren AL, Liu Y, Feuerstein G, Hallenbeck JM. Increased release of tumor necrosis factor-alpha into the cerebrospinal fluid and peripheral circulation of aged rats. *Stroke* 1993; 24:880-6; discussion 887-8.
112. Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP. Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci* 1992; 51:1953-6.
113. Belmin J, Bernard C, Corman B, Merval R, Esposito B, Tedgui A. Increased production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by arterial wall of aged rats. *Am J Physiol* 1995; 268:H2288-93.
114. Foster JA, Rich CB, Miller M, Benedict MR, Richman RA, Florini JR. Effect of age and IGF-I administration on elastin gene expression in rat aorta. *J Gerontol* 1990; 45:B113-8.
115. Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, et al. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20 Suppl 3:S9-15.
116. Emonard H, Hornebeck W. Binding of 92 kDa and 72 kDa progelatinases to insoluble elastin modulates their proteolytic activation. *Biol Chem* 1997; 378:265-71.

117. Makki T, Talom RT, Niederhoffer N, Amin F, Tankosic P, Mertes PM, et al. Increased arterial distensibility induced by the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, in normotensive rats. *Br J Pharmacol* 1994; 111:555-60.
118. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, et al. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *Am J Physiol* 1994; 267:R124-35.
119. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis* 1983; 3:64-76.
120. Blumenthal H, Lansing A, Wheeler P. Calcification of the media of the human aorta and its relation to intimal atherosclerosis, ageing and disease. *Am J Pathol* 1944; 20:665-673.
121. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E686-96.
122. Atkinson J. Arterial calcification. Mechanisms, consequences and animal models. *Pathol Biol (Paris)* 1999; 47:677-84.
123. Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int* 1994; 54:268-73.
124. Keeley FW, Partridge SM. Amino acid composition and calcification of human aortic elastin. *Atherosclerosis* 1974; 19:287-96.
125. Kirsch T. Determinants of pathological mineralization. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18:174-80.
126. Reslerova M, Moe SM. Vascular calcification in dialysis patients: pathogenesis and consequences. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:S96-9.
127. Mody N, Tintut Y, Radcliff K, Demer LL. Vascular calcification and its relation to bone calcification: possible underlying mechanisms. *J Nucl Cardiol* 2003; 10:177-83.
128. Donley GE, Fitzpatrick LA. Noncollagenous matrix proteins controlling mineralization; possible role in pathologic calcification of vascular tissue. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8:199-206.

129. Regal DS. [Effect of vitamin D3 on the formation of proteoglycans and tissue calcification]. *Acta Histochem Suppl* 1983; 27:265-78.
130. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999; 100:2168-76.
131. Otawara Y, Price PA. Developmental appearance of matrix GLA protein during calcification in the rat. *J Biol Chem* 1986; 261:10828-32.
132. Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986; 25:1176-80.
133. van de Loo PG, Soute BA, van Haarlem LJ, Vermeer C. The effect of Gla-containing proteins on the precipitation of insoluble salts. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142:113-9.
134. Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998; 8:357-75.
135. Fraser JD, Price PA. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J Biol Chem* 1988; 263:11033-6.
136. Doherty TM, Detrano RC. Coronary arterial calcification as an active process: a new perspective on an old problem. *Calcif Tissue Int* 1994; 54:224-30.
137. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386:78-81.
138. Gay BB, Jr., Kuhn JP. A syndrome of widened medullary cavities of bone, aortic calcification, abnormal dentition, and muscular weakness (the Singleton-Merten syndrome). *Radiology* 1976; 118:389-95.
139. Cormode EJ, Dawson M, Lowry RB. Keutel syndrome: clinical report and literature review. *Am J Med Genet* 1986; 24:289-94.

140. Cancela L, Hsieh CL, Francke U, Price PA. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem* 1990; 265:15040-8.
141. Cancela ML, Price PA. Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cells. *Endocrinology* 1992; 130:102-8.
142. Kirfel J, Kelter M, Cancela LM, Price PA, Schule R. Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:2227-32.
143. Kerr DN. Hypercalcemia and metastatic calcification. *Cardiovasc Res* 1997; 36:293-7.
144. Parfitt AM. Soft-tissue calcification in uremia. *Arch Intern Med* 1969; 124:544-56.
145. Baudet C, Perret E, Delpech B, Kaghad M, Brachet P, Wion D, et al. Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death program. *Cell Death Differ* 1998; 5:116-25.
146. Briehl MM, Miesfeld RL. Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1381-8.
147. de Boer-van den Berg M, van Haarlem L, Vermeer C. Vitamin K-dependent carboxylase in human vessel wall. *Thromb Res* 1986; (suppl)6:134.
148. Vermeer C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J* 1990; 266:625-36.
149. Jie KS, Bots ML, Vermeer C, Witteman JC, Grobbee DE. Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Atherosclerosis* 1995; 116:117-23.
150. Price PA, Rice JS, Williamson MK. Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human. *Protein Sci* 1994; 3:822-30.
151. Jones JI, Busby WH, Jr., Wright G, Smith CE, Kimack NM, Clemmons DR. Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth factor binding protein-1. Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *J Biol Chem* 1993; 268:1125-31.

152. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92:1686-96.
153. Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, et al. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol* 1993; 143:1003-8.
154. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; 92:2163-8.
155. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:279-303.
156. Kleinman JG, Beshensky A, Worcester EM, Brown D. Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. *Kidney Int* 1995; 47:1585-96.
157. McKee MD, Nanci A. Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues. *Microsc Res Tech* 1995; 31:44-62.
158. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000; 275:20197-203.
159. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:8819-23.
160. Singh K, DeVouge MW, Mukherjee BB. Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J Biol Chem* 1990; 265:18696-701.
161. Nagata T, Todescan R, Goldberg HA, Zhang Q, Sodek J. Sulphation of secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165:234-40.
162. Prince CW, Dickie D, Krumdieck CL. Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177:1205-10.

163. Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Maenpaa PH. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem* 1999; 274:1729-35.
164. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA, Schwartz SM, et al. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 1995; 95:713-24.
165. Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 1993; 268:9901-7.
166. Smith LL, Cheung HK, Ling LE, Chen J, Sheppard D, Pytela R, et al. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J Biol Chem* 1996; 271:28485-91.
167. Denda S, Reichardt LF, Muller U. Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* 1998; 9:1425-35.
168. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31:92-102.
169. Kasugai S, Zhang Q, Overall CM, Wrana JL, Butler WT, Sodek J. Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Miner* 1991; 13:235-50.
170. Prince CW, Butler WT. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Cell Relat Res* 1987; 7:305-13.
171. Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R, Jr., Li IW, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760:223-41.
172. Dey NB, Boerth NJ, Murphy-Ullrich JE, Chang PL, Prince CW, Lincoln TM. Cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits osteopontin and thrombospondin production in rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 82:139-46.

173. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243-53.
174. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:549-53.
175. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004; 95:1046-57.
176. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-76.
177. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397:315-23.
178. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999; 13:2412-24.
179. Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, et al. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4104-12.
180. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1998-2003.
181. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:57-66.
182. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res* 1992:275-94.
183. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res* 1995:266-80.

184. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26:99-105.
185. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 105:1325.
186. Rodan GA, Harada S. The missing bone. *Cell* 1997; 89:677-80.
187. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of *Cbfa1* and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 2001; 89:1147-54.
188. Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 2005; 357:1-8.
189. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 2005; 97:105-14.
190. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, et al. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000; 24:391-5.
191. Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 2003; 88:650-9.
192. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000; 87:1055-62.
193. Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 2001; 276:14044-52.
194. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, et al. A role for *smad6* in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000; 24:171-4.
195. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999; 274:584-94.

196. Piscione TD, Yager TD, Gupta IR, Grinfeld B, Pei Y, Attisano L, et al. BMP-2 and OP-1 exert direct and opposite effects on renal branching morphogenesis. *Am J Physiol* 1997; 273:F961-75.
197. Piscione TD, Phan T, Rosenblum ND. BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Smad1-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F19-33.
198. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 1991; 49:421-6.
199. Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem* 1983; 258:12723-7.
200. Boskey AL. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760:249-56.
201. Ushiki T, Abe K. Identification of arterial and venous segments of blood vessels using alkaline phosphatase staining of ink/gelatin injected tissues. *Arch Histol Cytol* 1998; 61:215-9.
202. Favus M, *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.*, W.W. Lippincott, Editor. 1999, Philadelphia. p. 3-29.
203. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:2003-9.
204. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991; 14:27-40.
205. Hui M, Li SQ, Holmyard D, Cheng P. Stable transfection of nonosteogenic cell lines with tissue nonspecific alkaline phosphatase enhances mineral deposition both in the presence and absence of beta-glycerophosphate: possible role for alkaline phosphatase in pathological mineralization. *Calcif Tissue Int* 1997; 60:467-72.
206. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 2001; 88:954-60.
207. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 2000; 102:2636-42.

208. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 1994; 93:2106-13.
209. Hart JP, Shearer MJ, Klenerman L, Catterall A, Reeve J, Sambrook PN, et al. Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K1 in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:1268-9.
210. Shearer MJ. The roles of vitamins D and K in bone health and osteoporosis prevention. *Proc Nutr Soc* 1997; 56:915-37.
211. Feskanich D, Weber P, Willett WC, Rockett H, Booth SL, Colditz GA. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:74-9.
212. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. Serum undercarboxylated osteocalcin and the risk of hip fracture. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:717-8.
213. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382:448-52.
214. Javed A, Gutierrez S, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al. Multiple Cbfa/AML sites in the rat osteocalcin promoter are required for basal and vitamin D-responsive transcription and contribute to chromatin organization. *Mol Cell Biol* 1999; 19:7491-500.
215. Locker FG. Hormonal regulation of calcium homeostasis. *Nurs Clin North Am* 1996; 31:797-803.
216. Gaillard V, Casellas D, Seguin-Devaux C, Schohn H, Dauca M, Atkinson J, et al. Pioglitazone improves aortic wall elasticity in a rat model of elastocalcinotic arteriosclerosis. *Hypertension* 2005; 46:372-9.
217. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:817-24.
218. Fleckenstein-Grun G, Thimm F, Frey M, Matyas S. Progression and regression by verapamil of vitamin D3-induced calcific medial degeneration in coronary arteries of rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:207-13.

219. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002; 161:2035-46.
220. Blair HC. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 1998; 20:837-46.
221. Kiel DP, Kauppila LI, Cupples LA, Hannan MT, O'Donnell CJ, Wilson PW. Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int* 2001; 68:271-6.
222. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1926-31.
223. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1610-6.
224. Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001; 358:257-9.
225. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12:1260-8.
226. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000; 192:463-74.
227. Stern PH, Tatrai A, Semler DE, Lee SK, Lakatos P, Strieman PJ, et al. Endothelin receptors, second messengers, and actions in bone. *J Nutr* 1995; 125:2028S-2032S.
228. von Schroeder HP, Veillette CJ, Payandeh J, Qureshi A, Heersche JN. Endothelin-1 promotes osteoprogenitor proliferation and differentiation in fetal rat calvarial cell cultures. *Bone* 2003; 33:673-84.
229. Nett PC, Ortmann J, Celeiro J, Haas E, Hofmann-Lehmann R, Tornillo L, et al. Transcriptional regulation of vascular bone morphogenetic protein by endothelin receptors in early autoimmune diabetes mellitus. *Life Sci* 2005.

230. Wu SY, Zhang BH, Pan CS, Jiang HF, Pang YZ, Tang CS, et al. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. *Peptides* 2003; 24:1149-56.
231. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000; 87:E10-7.
232. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1400-7.
233. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999; 82:1764-7.
234. Fleckenstein A, Frey M, Zorn J, Fleckenstein-Grun G. Experimental basis of the long-term therapy of arterial hypertension with calcium antagonists. *Am J Cardiol* 1985; 56:3H-14H.
235. Thorin E, Henrion D, Oster L, Thorin-Trescases N, Capdeville C, Martin JA, et al. Vascular calcium overload produced by administration of vitamin D3 and nicotine in rats. Changes in tissue calcium levels, blood pressure, and pressor responses to electrical stimulation or norepinephrine in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16:257-66.
236. Kieffer P, Robert A, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci* 2000; 66:2371-81.
237. Fleckenstein A, Fleckenstein-Grun G, Frey M, Zorn J. Calcium antagonism and ACE inhibition. Two outstandingly effective means of interference with cardiovascular calcium overload, high blood pressure, and arteriosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1989; 2:194-204.
238. Blacher J, Safar ME. Large-artery stiffness, hypertension and cardiovascular risk in older patients. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2:450-5.
239. Marque V, Van Essen H, Struijker-Boudier HA, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Determination of aortic elastic modulus by pulse wave velocity and wall tracking in a rat model of aortic stiffness. *J Vasc Res* 2001; 38:546-50.
240. O'Rourke MF. Isolated systolic hypertension, pulse pressure, and arterial stiffness as risk factors for cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 1999; 1:204-11.

241. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 2:63-8.
242. Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Cleutjens JP, Thijssen HH, De Mey JG, et al. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289:485-90.
243. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1014-21.
244. Gillessen T, Gillessen F, Sieberth H, Hanrath P, Heintz B. Age-related changes in the elastic properties of the aortic tree in normotensive patients: investigation by intravascular ultrasound. *Eur J Med Res* 1995; 1:144-8.
245. Davies MR, Hruska KA. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2001; 60:472-9.
246. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension* 1997; 29:999-1006.
247. Rasmussen LM, Ledet T. Aortic collagen alterations in human diabetes mellitus. Changes in basement membrane collagen content and in the susceptibility of total collagen to cyanogen bromide solubilisation. *Diabetologia* 1993; 36:445-53.
248. Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, Evan AP, Moe SM. Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis* 2001; 37:1267-76.
249. Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, et al. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1420-5.
250. Proudfoot D, Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* 2001; 26:245-51.
251. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; 61:638-47.

252. Takemoto M, Yokote K, Nishimura M, Shigematsu T, Hasegawa T, Kon S, et al. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:624-8.
253. Kocemba J, Kawecka-Jaszcz K, Gryglewska B, Grodzicki T. Isolated systolic hypertension: pathophysiology, consequences and therapeutic benefits. *J Hum Hypertens* 1998; 12:621-6.
254. Heagerty AM. Changes in vascular morphology in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 1991; 5 Suppl 1:3-8.
255. Moreau p, Nava E, Takase H, Lücher T, *Local regulation of vascular function: focus on endothelium-dependent mechanisms in normotension, hypertension and atherosclerosis.*, in *Pathophysiology of hypertension*, A. Zanchetti and G. Mancia, Editor. 1997, Elsevier: Amsterdam. p. 975-1006.
256. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, et al. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest* 1996; 98:899-905.
257. Lartaud-Idjouadiene I, Lompre AM, Kieffer P, Colas T, Atkinson J. Cardiac consequences of prolonged exposure to an isolated increase in aortic stiffness. *Hypertension* 1999; 34:63-9.
258. Grassi G, Seravalle G, Bertinieri G, Turri C, Dell'Oro R, Stella ML, et al. Sympathetic and reflex alterations in systo-diastolic and systolic hypertension of the elderly. *J Hypertens* 2000; 18:587-93.
259. Tsoucaris-Kupfer D, Benetos A, Legrand M, Safar ME. Pulse pressure gradient along the aortic tree in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats: effect of nicardipine. *J Hypertens* 1993; 11:135-9.
260. Schraven E, Trottnow D, Nitz RE. Inhibition of vitamin D3-induced vascular calcification by carbocromen. *Adv Myocardiol* 1983; 4:263-7.
261. Nishiya Y, Sugimoto S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biol Pharm Bull* 2001; 24:628-33.
262. Redlich K, Pietschmann P, Stulc T, Peterlik M. Comparative study on the effect of calcium channel blockers on basal and parathyroid hormone-induced bone resorption in vitro. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80:262-5.

263. Zaidi M, Alam AS, Bax BE, Shankar VS, Bax CM, Gill JS, et al. Role of the endothelial cell in osteoclast control: new perspectives. *Bone* 1993; 14:97-102.
264. Naruse M, Tanabe A, Seki T, Adachi C, Yoshimoto T, Mishina N, et al. Effects of two calcium channel blockers on messenger RNA expression of endothelin-1 and nitric oxide synthase in cardiovascular tissue of hypertensive rats. *J Hypertens* 1999; 17:53-60.
265. Shimizu M, Pelisek J, Nikol S. Vasculogenesis and angiogenesis depend on the developmental origin in the arterial tree. *Curr Med Chem* 2002; 9:1619-30.
266. Izzo JL, Jr., Shykoff BE. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement, and treatment. *Rev Cardiovasc Med* 2001; 2:29-34, 37-40.
267. Safar ME. Peripheral pulse pressure, large arteries, and microvessels. *Hypertension* 2004; 44:121-2.
268. Rajzer M, Klocek M, Kawecka-Jaszcz K. Effect of amlodipine, quinapril, and losartan on pulse wave velocity and plasma collagen markers in patients with mild-to-moderate arterial hypertension. *Am J Hypertens* 2003; 16:439-44.
269. Lopez B, Querejeta R, Varo N, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL, et al. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104:286-91.
270. Bhaskar HN, Udupa SL, Udupa AL. Effect of nifedipine and amlodipine on dead space wound healing in rats. *Indian J Exp Biol* 2005; 43:294-6.

Chapitre 7. Annexes

7.1. Approches méthodologiques

Certaines approches méthodologiques (utilisées dans mes travaux de doctorat) plus pointues et moins connues seront décrites plus en détail dans cette section.

7.1.1. Dissecteur 3D

Le nombre de CMLVs dans la tunique médiale de l'aorte peut être estimé par une technique histologique nommée dissecteur 3D. Cette méthode permet de compter les noyaux indépendamment de leur orientation, forme et grandeur. Deux coupes consécutives et longitudinales d'aorte d'une épaisseur de 4 μm et colorées avec de l'hématoxiline & éosine (colore la membrane cellulaire et le noyau) sont utilisées. Ces deux coupes sont définies comme la section du haut et celle du bas. Une surface arbitraire est délimitée (A_d) et le nombre de noyaux présents dans la section du haut (N_t) et dans la section du bas (N_b) sont comptés. Puis, la disparition des noyaux (N_d) correspond à la différence entre N_t et N_b . Le volume de la section (V_d) est calculé avec l'équation suivante : $V_d = (s-1)(t)(A_d)$ où s est le nombre de coupes et t l'épaisseur de la coupe. Finalement, le nombre de cellules par unité de longueur est obtenu par la multiplication de la densité cellulaire (N_v , le rapport entre N_d et V_d) par l'aire de section de l'aorte déterminée préalablement.

Cette méthode histologique relativement simple permet de déterminer la présence d'hyperplasie dans la paroi aortique. Toutefois, elle a certaines limites, en effet, le manipulateur peut être influencé par le résultat anticipé. Pour contrer cette possibilité, il est préférable que l'identification sur chacune des coupes soit camouflée et révélée après le

comptage des noyaux. De plus, l'estimation du nombre de cellules s'effectue dans une très petite section de l'aorte, il se peut qu'il y est une certaine hétérogénéité de la densité cellulaire entre différentes parties de l'aorte. Il est donc important de toujours prélever le même bout d'aorte pour des fins histologiques afin de minimiser cet impact.

7.1.2. Détermination de l'activité de l'anhydrase carbonique II et IV tissulaire

Cette méthode a pour but d'extraire et de mesurer l'activité de l'anhydrase carbonique cytosolique et membranaire à partir d'aortes prélevées de rats. La première étape consiste à extraire et séparer les protéines solubles et membranaires du tissu aortique. Pour ce faire, les sections d'aortes sont d'abord pulvérisées au pilon dans de la glace sèche, puis homogénéisés dans un tampon nommé Sato (25mM triethanolamine, pH 8.1, 59 mM Na_2SO_4 , 1 mM benzamidine chloride) pendant 2 minutes. Ensuite, les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 13000 rpm à 4°C. Cette première centrifugation sépare grossièrement les protéines solubles (dans le surnageant) et membranaires (dans le culot, non solubles dans le tampon Sato). Le surnageant est recentrifugé pendant 90 minutes à 28000 rpm (141000 g) à 4°C afin de s'assurer que toutes les protéines membranaire se retrouvent dans le culot. Le surnageant de cette deuxième centrifugation sera utilisé pour mesurer l'activité de l'anhydrase carbonique cytosolique (principalement l'AC II). Le culot des deux centrifugations sont réunis afin de dissoudre les protéines membranaires. Pour y arriver, le culot est incubé avec une agitation constante pendant 1 heure à température de la pièce dans une solution de deux détergents (10% SDS et 0.2% saponin dans le tampon Sato). Par la suite, on centrifuge le mélange pendant 30 minutes à 13 000 rpm à 15°C pour

se débarrasser des débris tissulaires. Le surnageant sera utilisé pour mesurer l'activité de l'anhydrase carbonique membranaire (principalement l'AC IV).

L'activité de l'anhydrase carbonique est ensuite mesurée par une méthode colorimétrique. Chaque échantillon est saturé avec du CO₂, puis 75 µl de tampon imidazole-Tris contenant du p-nitrophénol (20 mM imidazole, 5 mM Tris et 0.4 mM p-nitrophénol, pH 9.4-9.9) est déposé dans une cuvette à spectrophotomètre. La cuvette est placée dans le spectrophotomètre préalablement ajusté à une longueur d'onde de 407 nm. Au moment où 25 µl de l'échantillon saturé en CO₂ est mélangé avec le 75 µl de tampon dans la cuvette, l'expérience débute. Le temps est arrêté lorsque la densité optique se stabilise (car l'échantillon passe du jaune à l'incolore en s'acidifiant, résultat de l'activité de l'AC). Il est préférable de faire un blanc avec le tampon ainsi qu'un contrôle négatif avec un échantillon bouilli (permet l'inactivation de l'AC). L'activité de l'AC est calculée en unité enzymatique (EU) par mg de protéines avec l'équation suivante :

$$\text{Activité de l'AC (EU/mg de protéines)} = \log (B/S) / (\text{prot}) \log 2$$

où B est le temps pour l'échantillon bouilli en secondes, S le temps pour les échantillons en secondes et (prot) représente la quantité de protéines en mg présentes dans l'échantillon.

Cette méthode expérimentale permet de véritablement vérifier si l'AC présente dans l'aorte est fonctionnelle ou non. Cette approche est complémentaire à l'immunobuvardage (donne un indice de la quantité d'AC présent dans un tissu) et à l'immunohistochimie (permet de localiser l'AC sur une coupe histologique). Il faut cependant prendre en considération que cette approche dépend de l'intégrité de l'enzyme pour mesurer son

activité. Il est donc important de travailler dans des conditions optimales (toujours à 4°C)^V pour ne pas dénaturer l'AC. De plus, afin de contrer l'hétérogénéité de l'aorte (thoracique versus abdominale) il est primordial d'utiliser un bout d'aorte localisé toujours au même endroit. Finalement, comme le chronomètre n'est pas arrêté à une densité optique précise (l'échantillon doit être incolore), il est important que ce soit toujours la même personne qui fasse l'expérience afin de s'assurer d'une certaine homogénéité dans la mesure de l'activité de l'AC entre les différents échantillons pour une même étude.

7.1.3. Micro-computerized tomography (micro-CT)

Le micro-CT permet de visualiser en trois dimensions les dépôts de minéraux dans différents objets ou tissus de petite dimension dont l'aorte de rat. L'aorte est fixée avec une solution de paraformaldéhyde 4% puis repliée sur elle-même (afin de pouvoir entrer dans la chambre micro-CT) et enveloppée dans un film de plastique (pour que l'aorte ne sèche pas). Une fois la chambre fermée, l'aorte est scannée par des rayons-X (pour plus de détails techniques voir p.151). Au cours de l'opération l'aorte subit plusieurs étapes de rotation (0.9 degré chaque) permettant une reconstruction tri-dimensionnelle de l'aorte (à l'aide d'un logiciel informatique). Il est alors possible de visualiser la distribution tri-dimensionnelle des dépôts de minéraux tout au long de l'aorte.

Cette approche expérimentale a cependant certaines limites, c'est pourquoi il est préférable de la jumeler à d'autres méthodes complémentaire. Ainsi, il sera possible d'avoir une meilleure vue d'ensemble des dépôts de minéraux dans l'aorte. La coloration au von Kossa permet de déterminer la localisation des minéraux sur une coupe transversale

d'aorte. Comme ces deux méthodes ne sont pas quantitatives, la méthode colorimétrique utilisant le complexe o-crésolphtaléine (kit de chez Sigma) permet de déterminer la concentration de calcium dans l'aorte.

7.1.4. Quantification de l'ondulation des lamelles élastiques

Grâce à la coloration von Kossa (coloration pour minéraux) et Verhoeff (coloration pour l'élastine), il a été possible d'observer que le traitement WVK (chez le rat) induisait une calcification des lamelles élastiques créant une ondulation de ces dernières. Comme dans la littérature il n'existe pas de méthode pour étudier de manière quantitative l'architecture des lamelles élastiques, l'équipe du Dr. Nekka s'est jointe à la notre afin de mettre au point le programme informatique nécessaire à cette approche méthodologique. Ainsi, pour quantifier l'ondulation (son amplitude ou énergie) des lamelles élastiques, des photos de coupes transversales d'aortes colorés avec du Verhoeff ont été traités avec un programme informatique (grâce au logiciel MatLab). La première étape du programme était de tracer des courbes à partir de la forme des lamelles élastiques (pour plus de détails voir p.184) dans les zones non calcifiées et calcifiées. La deuxième étape consistait à attribuer une énergie à chacune des lamelles élastiques (maintenant représentées informatiquement). Une lamelle élastique linéaire possède un signal énergétique très bas (en dessous de 20), tandis qu'une ondulée aura un signal supérieur à 20.

Le programme informatique amène cependant certaines contraintes. Effectivement, s'il y a une interruption dans la lamelle élastique (avec la coloration Verhoeff), le programme ne pourra tracer la courbe correspondante à la lamelle élastique. De plus, la

délimitation de la zone calcifiée est arbitraire (on se fie à la coloration von Kossa d'une coupe adjacente).

7.2. Articles originaux

1. **Essalihi R.**, Zandviel M.L., Moreau S., Gilbert L.-A., Lenoël C., Nekka F., McKee M.D. & Moreau P. Distinct Effects of Amlodipine Treatment on Vascular Elastocalcinosis and Stiffness in a Rat Model of Isolated Systolic Hypertension. Ce manuscrit sera soumis au *Journal of Hypertension*.
2. **Essalihi R.**, Dao H.H., Gilbert L.-A., Bouvet C., Semerjian Y., McKee M.D. & Moreau P. Regression of Medial Elastocalcinosis in the Rat Aorta: A New Vascular Function for Carbonic Anhydrase. *Circulation* 2005, **112**(11):1628-35.
3. Dao H.H., **Essalihi R.**, Bouvet C. et Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: Impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovascular Research* 2005, **66**: 307-317. Article de revue
4. **Essalihi R.**, Ouellette V., Dao H.H., McKee M.D. & Moreau P. Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: A Role for Endothelin? *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2004, **44**(Supp.1):S147-S150.
5. **Essalihi R.***, Dao H.H.&*, Yamaguchi N. & Moreau P. A New Model of Isolated Systolic Hypertension by Chronic Warfarin and Vitamin K₁ Treatment. *American Journal of Hypertension* 2003 Feb, **16**(2):103-110. *Les 2 premiers auteurs ont contribués de manière équivalente au manuscrit.
6. Dao H.H.*, **Essalihi R.***, Graillon J.-F., Larivière R., de Champlain J. & Moreau P. Pharmacological Prevention and Regression of Arterial Remodeling in a Rat Model of

Isolated Systolic Hypertension. *Journal of Hypertension* 2002, **20**:1597-1606. *Les 2 premiers auteurs ont contribué de manière équivalente au manuscrit.

7.3. Résumés pour présentation à des congrès

1. **Essalihi R.**, Servant M., McKee M.D. & Moreau P. L'Endothéline Inhibe l'Anhydrase Carbonique IV via P38 dans un Modèle de Calcification Vasculaire *In Vitro*. 14ième Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. Montréal (Québec, Canada) 12-14 janvier 2006, [Médecine Sciences 2006, Vol.22, Supp.1, p.25]. (Présentation par affiche)

2. **Essalihi R.**, Dao H.H., Servant M., McKee M.D. & Moreau P. Medial Vascular Calcification (Elastocalcinosis) as a New Pathological Paradigm Involving Endothelin. Ninth International Conference on Endothelin (ET-9). Park City (Utah, USA) 11-14 septembre 2005, [Dans le « proceeding » du congrès]. (Présentation orale)

3. **Essalihi R.**, Servant M., McKee M.D. & Moreau P. An Endothelin Receptor ETA Antagonist Prevents Vascular Calcification in an In Vitro Model Produced by Warfarin Treatment. XVIth Scientific Meeting of the Interamerican Society of Hypertension. Cancun (Mexique) 17-21 avril 2005. [Dans le « proceeding » du congrès, p.81] (Présentation par affiche)

4. **Essalihi R.**, Servant M., McKee M.D. & Moreau P. Modèle de Calcification In Vitro Utilisant des Cellules Musculaires Lisses Vasculaires de Rat. 13ième Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. Québec (Québec, Canada) 13-15 janvier 2005, [Médecine Sciences 2005, Vol.21, Supp.1, p.20]. (Présentation par affiche)

5. **Essalihi R.**, Servant M., McKee M.D. & Moreau P. *In vitro* Model of Vascular Calcification in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. Canadian Cardiovascular Congress.

Calgary (Alberta, Canada) 23-27 octobre 2004, [The Canadian Journal of Cardiology 2004, Vol 20, Supp D, p.105D]. (Présentation par affiche)

6. **Essalihi R.**, Zandvliet M., Dao H.H. & Moreau P. Amlodipine Prevents and Regresses Aortic Medial Calcification in a Rat Model of Isolated Systolic Hypertension. The XIIIth International Vascular Biology Meeting (IVBM). Toronto (Ontario, Canada) 1-5 juin 2004. [Cardiovascular Pathology 13 (2004) S184-S185] (Présentation par affiche)

7. **Essalihi R.**, Dao H.H. & Moreau P. Carbonic Anhydrase is Involved in the Regression of Medial Aortic Calcification Induced by an Endothelin Receptor Antagonist. The XIIIth International Vascular Biology Meeting (IVBM). Toronto (Ontario, Canada) 1-5 juin 2004. [Cardiovascular Pathology 13 (2004) S185] (Présentation par affiche)

8. **Essalihi R.**, Zandvliet M., Dao H.H. & Moreau P. L'Amlodipine Prévient et Régresse la Calcification Aortique Médiale dans un Modèle d'Hypertension Systolique Isolée chez le Rat. 12ième Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. Montréal (Québec, Canada) 15-17 janvier 2004, [Médecine Sciences 2004, Vol.20, Supp.1, p.21]. (Présentation par affiche)

9. **Essalihi R.**, Ouellette V., Dao H.H., McKee M.D. & Moreau P. Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification : A Role for Endothelin ? ET-8 (Eighth International Conference on Endothelin). Tsukuba (Ibaraki, Japon) 23-26 novembre 2003, [Dans le « proceeding » du congrès]. (Présentation par affiche)

10. **Essalihi R.**, Zandvliet M., Dao H.H. & Moreau P. A Calcium Channel Blocker Prevents and Regresses Aortic Medial Calcification in a Rat Model of Isolated Systolic Hypertension. Canadian Cardiovascular Congress. Toronto (Ontario, Canada) 24-27 octobre 2003, [The Canadian Journal of Cardiology 2003, Vol 19, Supp A, p.112A]. (Présentation orale)

11. **Essalihi R.**, Zandvliet M., Dao H.H. & Moreau P. Prévention et Régression de la Calcification Aortique Médiale par l'Amlodipine et un Antagoniste de l'Endothéline dans un Modèle d'Hypertension Systolique Isolée chez le Rat. 8^{ième} Mini-Symposium Sous-Réseau F.R.S.Q. Endothélium et ses Maladies associées. Montréal (Québec, Canada) 6-7 avril 2003. (Présentation par affiche)

12. **Essalihi R.**, Dao H.H., Semerjian Y., Moreau P. L'Anhydrase Carbonique Participe à la Régression de la Calcification Aortique Médiale dans un Modèle d'Hypertension Systolique Isolée. 11^{ième} Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. Québec (Québec, Canada) 16-18 janvier 2003, [Médecine Sciences 2003]. (Présentation par affiche).

13. **Essalihi R.**, Dao H.H., Semerjian y., Moreau P. Régression de la Calcification Aortique Médiale par un Antagoniste des Récepteurs de l'Endothéline dans un Modèle d'Hypertension Systolique Isolée: Rôle de l'Anhydrase Carbonique. XXII^{es} Journées de l'Hypertension Artérielle. Paris (France) 12-13 décembre 2002, [Les Archives des Maladies de Coeur 2002, Tome 95 – Hors Série, p.16]. (Présentation orale)

14. **Essalihi R.**, Dao H.H., Moreau P. Endothelin Receptor Antagonist Regress Aortic Medial Calcification in a Rat Model of Isolated Systolic Hypertension: Role of Carbonic Anhydrase. Canadian Cardiovascular Congress. Edmonton (Alberta, Canada) 26-28 octobre 2002, [The Canadian Journal of Cardiology 2002, Vol.18, Supp. B, p.138B]. (Présentation orale)

15. **Essalihi R.**, Dao HH, Semerjian Y, Moreau P (Parrain: Turgeon J) L'Anhydrase Carbonique Participe à la Régression de la Calcification Aortique Médiale chez le Rat. 44^{ième} Réunion annuelle du Club de Recherche Clinique du Québec. St-Sauveur (Québec, Canada) 19-21 septembre 2002, [Médecine Sciences 2002, Vol.18, Supp.2, p.20]. (Présentation par affiche)

16. **Essalihi R.**, Dao H.H., Moreau P. Régression de la calcification aortique et du ratio collagène/élastine par des antagonistes des récepteurs AT1 et ETA dans un modèle d'hypertension systolique isolée chez le rat. 10ième Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. Montréal (Québec, Canada) 10-12 janvier 2002, [Médecine Sciences 2001, Vol.18, Supp.1, p.20]. (Présentation par affiche)

17. **Essalihi R.**, Dao H.H., Moreau P. Regression of aortic calcification and collagen/elastin ratio by antagonists of AT1 or ETA receptors in a rat model of isolated systolic hypertension. Congrès canadien sur la santé cardiovasculaire. Halifax (Nouvelle-Écosse, Canada) 20-23 octobre 2001, [The Canadian Journal of Cardiology 2001, Vol.17, Supp.C, p.138C]. (Présentation par affiche)

18. **Essalihi R.**, Dao H.H., Moreau P. Irbesartan reverses hypertrophic remodeling of middle cerebral arteries in an isolated systolic hypertension model. 7th international symposium on resistance arteries. Muskoka Sands (Ontario, Canada) 4-8 juillet 2001, [Journal of Vascular Research 2001, Vol.38, Supp.2, p.17]. (Présentation orale)

19. **Essalihi R.**, Dao H.H., Moreau P. Regression of aortic calcification by an antagonists of AT1 or ETA receptors in a rat model of isolated systolic hypertension (ISH). Second Annual Conference on ATVB, page P185. Arlington (Virginia, USA) 11-13 mai 2001, [Dans le « proceeding » du congrès]. (Présentation par affiche)

20. **Essalihi R.**, Dao H.H., Moreau P. Régression de la calcification aortique par un antagoniste des récepteurs AT(1) ou ET(A) dans un modèle d'hypertension systolique isolée (HSI). 69ième Congrès de l'Acfas. Sherbrooke (Québec, Canada) 14-17 mai 2001, [Dans le « proceeding » du congrès]. (Présentation orale)

21. Dao H.H., **Essalihi R.**, Moreau P. Efficacité des antihypertenseurs sur la normalisation de l'hypertrophie des petites artères induite par l'hypertension systolique isolée

expérimentale. 10ième Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. Québec (Québec, Canada) 10-12 janvier 2002, [Médecine Sciences 2001, Vol.18, Supp. 1, p.18].

22. Dao H.H., **Essalihi R.**, Moreau P. Antagonism of endothelin and angiotensin II receptors prevents aortic calcification and small arterial hypertrophie in experimental isolated systolic hypertension. Congrès canadien sur la santé cardiovasculaire. Halifax (Nouvelle-Écosse, Canada) 20-23 octobre 2001, [The Canadian Journal of Cardiology 2001, Vol.17, Supp.C, p.138C].

23. Dao H.H., **Essalihi R.**, de Champlain J., Moreau P. Aortic medial calcification in matrix Gla protein deficient rats induces isolated systolic hypertension: prevention and regression by endothelin and angiotensin II receptors antagonists. 55th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research. Chicago (Illinois, USA) 22-25 septembre 2001, [Hypertension 2001, Vol.38, Numero 3, p.532].

24. Dao H.H., **Essalihi R.**, de Champlain J., Moreau P. Antagonism of endothelin and angiotensinII receptors prevent small arterial hypertrophy in an isolated systolic hypertension model. 7th international symposium on resistance arteries. Muskoka Sands (Ontario, Canada) 4-8 juillet 2001, [Journal of Vascular Research 2001, Vol.38, Supp.2, p.17].

25. Vuong D.H., Cajello M., Elagoz A., Collin P., **Essalihi R.**, Rokeach,L.A. Implication de la calnexine dans le repliement protéique chez la levure S.pombe. 68ième Congrès de l'Acfas.Montréal (Québec,Canada) 15-19 mai 2000, [Dans le « proceeding » du congrès].